



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας» «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης σε πολυφαινολικά εκχυλίσματα
από τα φυτά *Achillea millefolium*, *Mentha spicata*, *Origanum onites* της
ελληνικής χλωρίδας

ΣΙΜΣΙΡΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ



ΛΑΡΙΣΑ 2019

Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης σε πολυφαινολικά
εκχυλίσματα από τα φυτά *Achillea millefolium*, *Mentha spicata*,
Origanum onites της ελληνικής χλωρίδας

Assessment of antioxidant activity of polyphenolic extracts from
plants *Achillea millefolium*, *Mentha spicata*, *Origanum onites* of
Greek flora.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σέρκος Χαρουτουγιάν: Καθηγητής Χημείας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Στάγκου Δημητρίου, Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Κουρέτα Δημήτριο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου διατριβή στο εργαστήριο του.

Τέλος ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους και το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον γύρω από το πεδίο των ελευθέρων ριζών, του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών μορίων. Μετά από πολλές μελέτες που έχουν γίνει, είναι πλέον γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες, σχετίζονται με πλήθος ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα κ.α. ενώ τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών αποτελούν οι φυτικές πολυφαινόλες. Οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Επίσης έχουν αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Έχει βρεθεί ότι αρκετά φυτικά εκχυλίσματα είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκαν εκχυλίσματα από τα είδη φυτών *Achillea millefolium* της οικογένειας Asteraceae, *Anthemis* sp. της οικογένειας Asteraceae, *Coriander sativum* της οικογένειας Apiaceae, *Helleborus cyclophyllus* της οικογένειας Ranunculaceae, *Mentha spicata* της οικογένειας Lamiaceae, *Oropanax chironium* της οικογένειας Apiaceae, *Origanum onites* της οικογένειας Lamiaceae, *Psoralea bituminosa* της οικογένειας Fabaceae και *Senecio eubaeus* της οικογένειας Asteraceae.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε in vitro η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS, και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Με την μέθοδο DPPH ισχυρότερα αναδείχθηκαν το υδατικό εκχύλισμα του *Origanum onites* και το μεθανολικό εκχύλισμα του *Mentha spicata* με τιμές IC₅₀ 25,78μg/ml και 31,91μg/ml αντίστοιχα. Και με τη μέθοδο ABTS ισχυρότερα αναδείχθηκαν το υδατικό εκχύλισμα του *Origanum onites* και το μεθανολικό εκχύλισμα του *Mentha spicata* με τιμές IC₅₀ 21,51μg/ml και 23,06μg/ml αντίστοιχα. Επίσης εξετάστηκε το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, όπου τις μεγαλύτερες τιμές έδειξαν και πάλι το μεθανολικό εκχύλισμα του *Mentha spicata* και το υδατικό εκχύλισμα του *Origanum onites* με 140 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας και 124 mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν σημαντικές ενδείξεις για την αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ορισμένα από τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη όσον αφορά τις ευεργετικές τους δράσεις.

ABSTRACT

In recent years there has been an increase interest on the fields of free radicals, oxidative stress and antioxidant molecules. Several studies have shown that free radicals and oxidative stress are related to a number of diseases such as cancer, and cardiovascular diseases, while the antioxidant molecules have the ability to interact and neutralize free radicals. One of the most important categories of antioxidants is plant polyphenols. Plant polyphenols have the ability to neutralize free radicals, protecting from the consequences of oxidative stress. Moreover, they exhibit antiinflammatory and antimicrobial activity. It has been found that many plant extracts are rich in polyphenols. In the present study, plant extracts derived from *Achillea millefolium* (Asteraceae family), *Anthemis* sp. (Asteraceae family), *Coriander sativum* (Apiaceae family), *Helleborus cyclophyllus* (Ranunculaceae family), *Mentha spicata* (Lamiaceae family), *Opopanax chironium* (Apiaceae family), *Origanum onites* (Lamiaceae family), *Psoralea bituminosa* (Fabaceae family) and *Senecio eubaeus* (Asteraceae family) were examined in vitro for their antioxidant activity.

Specifically, it was examined in vitro the antioxidant activity of the aforementioned plant extracts by using the DPPH and ABTS assays. Moreover, the total phenolic content was assessed by using the Folin-Ciocalteu assay. The aquatic extract of *Origanum onites* and the methanolic extract of *Mentha spicata* were found in the DPPH assay to be the most potent, with IC₅₀ values of 25.78µg/ml and 31.91µg/ml, respectively. In the ABTS assay, the most potent extracts were again the aquatic extract of *Origanum onites* and the methanolic extract of *Mentha spicata* with IC₅₀ values of 21.51µg/ml και 23.06µg/ml, respectively. Moreover, regarding the total phenolic content assessed by Folin-Ciocalteu assay, the methanolic extract of *Mentha spicata* and the aquatic extract of *Origanum onites* exhibited the highest values: 140mg TPC/g dry extract and 124 mg TPC/g dry extract, respectively.

The results of the present study provided significant indications regarding the antioxidant activity of the plant extracts examined suggesting that some of them are interesting for further studies on their beneficial effects on human health.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	10
1.3. Βιολογικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	11
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	13
1.4.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	14
1.4.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	15
1.5. Οξειδωτικό στρες.....	17
1.6. Πολυφαινόλες.....	19
1.6.1. Φλαβονοειδή.....	20
1.6.2. Πολυφαινολικά οξέα.....	20
1.6.3. Στιλβένια.....	20
1.6.4. Λιγνάνες.....	21
1.7. <i>Achillea millefolium</i>	21
1.8. <i>Anthemis sp.</i>	22
1.9. <i>Coriander sativum</i>	23
1.10. <i>Helleborus cyclophyllus</i>	24
1.11. <i>Mentha spicata</i>	24
1.12. <i>Oropanax chironium</i>	25
1.13. <i>Origanum onites</i>	25
1.14. <i>Psoralea bituminosa</i>	26
1.15. <i>Senecio eubaeus</i>	27
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	28
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
3.1.Αντιδραστήρια.....	28
3.2. Εκχυλίσματα.....	28
3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•.....	29
3.3.1. Πειραματική διαδικασία.....	30
3.3.2. Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.....	31
3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+.....	31
3.4.1. Πειραματική διαδικασία.....	32
3.4.2. Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση.....	33
3.5. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (TotalPhenolicContent, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	34

3.5.1. Πειραματική διαδικασία	34
4. Αποτελέσματα Μετρήσεων	36
4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH	36
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+.....	41
4.3. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων (TotalPolyphenolicContent, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	47
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται οποιοδήποτε μόριο ή άτομο το οποίο είναι ικανό για αυτοδύναμη ύπαρξη και περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα. Με τον όρο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εννοείται αυτό που καταλαμβάνει ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό μόνο του. (Halliwell&Gutteridge,2015). Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas, C. and Kouretas, D., 1999). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή μόρια και αντιδρούν με άλλα μόρια αποσκοπώντας στην συμπλήρωση της εξωτερικής ηλεκτρονιακής τους στοιβάδας.

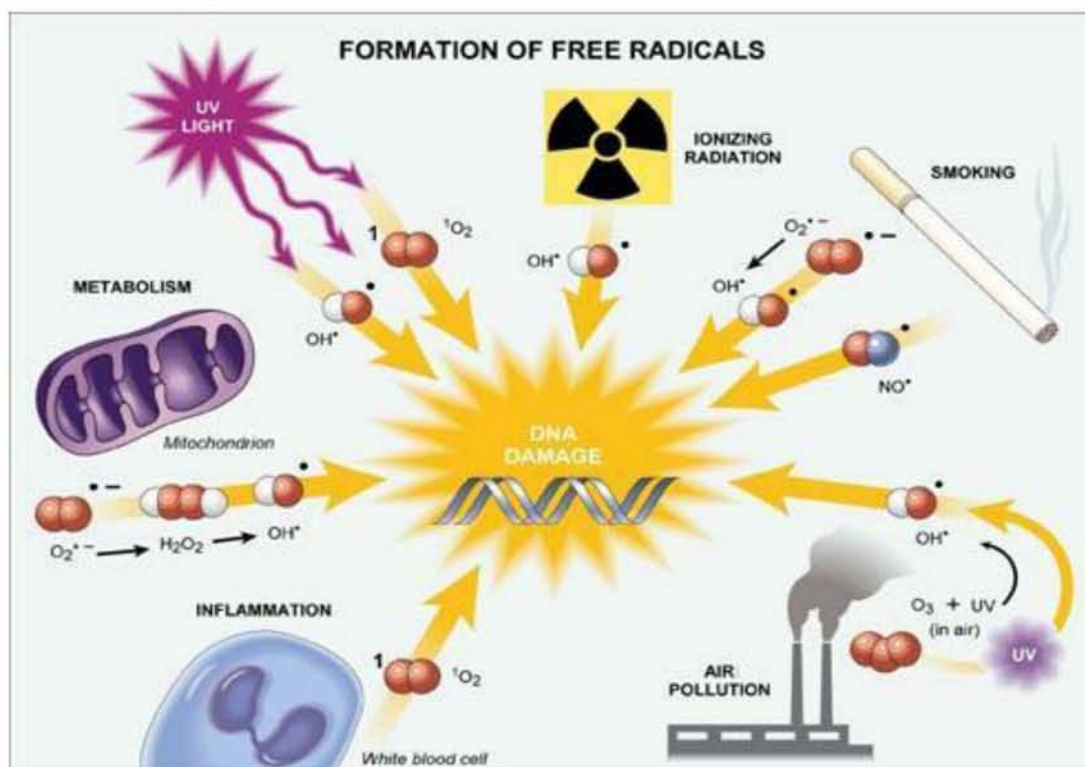
Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστηριότητα (Valavanidis, 2006). Έτσι, όταν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell&Gutteridge, 2015). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη ελεύθερη ρίζα τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al,1993; Wilson, 1978).

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου. Το άτομο του υδρογόνου έχει μόνο ένα ηλεκτρόνιο και για αυτό θα πρέπει να είναι ασύζευκτο. Ακόμη, το διατομικό μόριο του οξυγόνου αποτελεί και αυτό μία ελεύθερη ρίζα επειδή έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Στις ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCl) που προέρχονται από το χλώριο. Ο όρος ROS (Reactive oxygen species) είναι ένας συλλογικός όρος για είδη που προέρχονται από το οξυγόνο και είναι πιο αντιδραστικά από αυτό. Ο όρος αυτός περιλαμβάνει τις ρίζες σουπεροξειδίου($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξειδίου(RO^{\cdot}), υδροϋπεροξειδίου(HO_2^{\cdot}) αλλά και κάποιες μη ρίζες οι οποίες είναι το υπεροξείδιο

του υδρογόνου(H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ(HOCl), το υποβρωμιώδες οξύ(HOBr), το όζον(O_3) και το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$). Συνεπώς όλες οι ρίζες του οξυγόνου ανήκουν στις ROS αλλά δεν είναι όλες οι ROS ρίζες του οξυγόνου. Οι RNS, RSS, RCIs μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS(Giles&Jacob,2002).

1.2. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε διάφορα βιολογικά συστήματα (Halliwell B, 2001). Μπορούν να παραχθούν ως παραπροϊόν κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Πέρα από τα μιτοχόνδρια που είναι η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών, μια άλλη πηγή ελευθέρων ριζών αλλά και H_2O_2 αποτελούντα υπεροξειδιοσώματα. Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων επικίνδυνων για το κύτταρο ουσιών με στόχο την απομάκρυνσή τους από το κύτταρο(Berg *et al.*, 2010). Στα ηπατικά αλλά και σε άλλα κύτταρα, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών. Επίσης, πηγές ελευθέρων ριζών αποτελούν η λιπιδική οξείδωση, η ακτινοβολία, οι φλεγμονές, το κάπνισμα και η μολυσμένη ατμόσφαιρα. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των πηγών ελευθέρων ριζών

1.3. Βιολογικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για την κυτταρική λειτουργία και την άμυνα του οργανισμού, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι υπεύθυνες για κυτταρικές βλάβες (Ντουνούση *et al.*, 2009).

Θετικές επιδράσεις

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες ρυθμίζουν την ομοιόσταση και την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών επειδή συμμετέχουν στη μεταβίβαση οξειδοαναγωγικών σημάτων και στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001) και ενεργοποιούν τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Επίσης συμμετέχουν στην έκφραση γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη φλεγμονή (Fehrenbach *et al.*, 2001, Reid 1992). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finnaud *et al.*, 2006).

Αρνητικές επιδράσεις

Η υπερβολική όμως παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι επιζήμια για τον οργανισμό. Εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell&Gutteridge, 2015), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Betters et al., 2004). Επίσης η μεγάλη αστάθεια και η υψηλή αντιδραστικότητά τους τις κάνει ικανές να αντιδράσουν με όλα σχεδόν τα βιομόρια. Πιο συγκεκριμένα, οξειδώνουν τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Επιπλέον, έχουν συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell&Gutteridge, 2015).

Οξείδωση λιπιδίων

Τα λιπίδια είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Αποτελούν συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και κυτταρικών οργανιδίων. Κατά συνέπεια οι κυτταρικές μεμβράνες και τα κυτταρικά οργανίδια είναι ευάλωτα στη δράση ελευθέρων ριζών οι οποίες προκαλούν ποικίλες βλάβες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η συνολική διαδικασία της λιπιδικής υπεροξείδωσης περιγράφεται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμός (termination) (Girotti, 1985). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την οξείδωση των PUFA και είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO^\bullet , συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεϋδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Έρευνες έχουν δείξει ότι η οξείδωση των λιπιδίων έχει σχέση με την γενικότερη υγεία του οργανισμού και ειδικότερα με την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης, (Guo et al., 2001, Witztum&Steinberg, 2001) της καρδιακής ανεπάρκειας (Mozaffarian et al., 2004) και της στεφανιαίας νόσου (Zaloga et al., 2006).

Οξείδωση πρωτεϊνών

Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να επηρεάσει την τριτοταγή τους δομή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών. Μπορεί να επέλθει ακόμα και καταστροφή των πρωτεϊνών η οποία έχει σημαντικές

κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Αποτέλεσμα της οξείδωσης είναι ο σχηματισμός ουσιών οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Όμως, τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα. (Levine, 2002)

Οξείδωση DNA

Το DNA είναι σε γενικές γραμμές ένα σταθερό μόριο. Παρ' όλα αυτά οι ROS είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να του προκαλέσουν βλάβες. Τέτοιες βλάβες είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόξη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA με αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

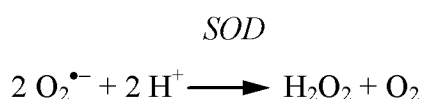
Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να θεωρηθεί κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά της (βιομόρια), καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν προκληθεί από τις ελεύθερες ρίζες. Πιο αναλυτικά, ένα αντιοξειδωτικό είναι ένα μόριο αρκετά σταθερό για να δώσει ένα ηλεκτρόνιο σε μία ελεύθερη ρίζα και συνεπώς να την αδρανοποιήσει. Κάποια από τα αντιοξειδωτικά αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τερματίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση πριν προκληθούν βλάβες σε ζωτικά μόρια. Κάποια από τα αντιοξειδωτικά παράγονται κατά το μεταβολισμό στο σώμα ενώ κάποια άλλα λαμβάνονται με τη διατροφή.

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς:

1.4.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

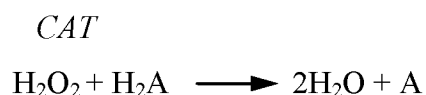
Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι των ριζών σουπεροξειδίου και του οξειδωτικού στρες (Mylonas&Kouretas, 1999). Η SOD καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet -}$ το μεγαλύτερο μέρος του οποίου ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers&Lennon, 2000) και ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Cu-Zn SOD) (Das et al., 1997).

Καταλάση

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο, που εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Masters *et al.*, 1986). Η καταλάση καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση



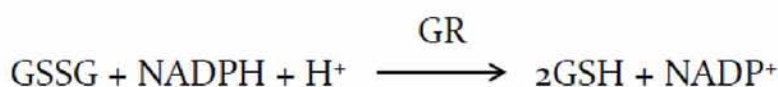
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx)

Είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων καθώς και στον εξωκυττάριο χώρο. Η GPx καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό οξειδώνοντας την GSH σε GSSG (οξειδωμένη μορφή) σύμφωνα με την αντίδραση:



Αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο(FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.



1.4.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο, το οποίο περιέχει κυστεΐνη και αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό. Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στη συνεχή και κυκλική μετάπτωσή της από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίθετο. Αυτό οφείλεται στην θειολική ομάδα της κυστεΐνης η οποία είναι αναγωγικός παράγοντας και μπορεί αναστρέψιμα να οξειδωθεί και να αναχθεί. Η γλουταθειόνη είναι ένα ευρέως διαδεδομένο μόριο που παράγεται σε όλα τα όργανα, κυρίως στο ήπαρ, στον σπλήνα, στους νεφρούς. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Μπορεί και εξουδετερώνει απευθείας τις ελεύθερες ρίζες ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May et al., 1996) διατηρώντας τες στην ενεργή ανηγμένη μορφή τους και μπορεί και να απομακρύνει ξενοβιοτικά.

Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C ή αλλιώς το ασκορβικό οξύ είναι ένας μονοσακχαρίτης που βρίσκεται τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά. Δεν μπορεί να συντεθεί στο ανθρώπινο σώμα και για αυτό θα πρέπει να προσλαμβάνεται με την διατροφή. Η βιταμίνη C είναι ένας αναγωγικός παράγοντας και μπορεί να μειώσει και να εξουδετερώσει άμεσα τις ROS όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου.(Halliwell&Gutteridge, 2015). Επιπλέον, πέρα από τις άμεσες αντιοξειδωτικές επιδράσεις, η βιταμίνη C αποτελεί επίσης υπόστρωμα για το αντιοξειδωτικό ένζυμο ασκορβική υπεροξειδάση (ascorbate peroxidase). Αυτή της η λειτουργία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανοχή σε στρες των φυτών. (Shigeoka, et.al, 2002)

Βιταμίνη E

Βιταμίνη E είναι ένα συλλογικό όνομα για ένα σετ 8 σχετιζόμενων τοκοφερολίων και τοκοτριενολών, που είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Herrera E.,Barbas C., 2001. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη, με τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξείδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Traber MG., Atkinson J., 2007). Επίσης, προστατεύει από την οξείδωση την βιταμίνη A (Halliwell&Gutteridge, 2015).

Βιταμίνη A (ρετινόλη) και β-καροτένιο

Η βιταμίνη A είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη. Το β-καροτένιο εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν απαιτείται από τις ανάγκες του οργανισμού. Ουσίες οι οποίες στο σώμα του ανθρώπου μετατρέπονται σε βιταμίνη A ονομάζονται προβιταμίνες A και το β-καροτένιο είναι μία από αυτές. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και το σελήνιο(Halliwell&Gutteridge, 2015).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988) και στη συνέχεια μέσω διάχυσης στα μυϊκά κύτταρα, τα προστατεύει από τις ROS. Περίπου η μισή αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος οφείλεται στο ουρικό οξύ.

Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Μελατονίνη

Η μελατονίνη είναι μια ορμόνη η οποία εντοπίζεται στα ζώα και σε κάποιους άλλους έμβιους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου των αλγών. (Caniato R., et al. 2003). Η μελατονίνη είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να περάσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό. (Reiter RJ., et al. 1997).

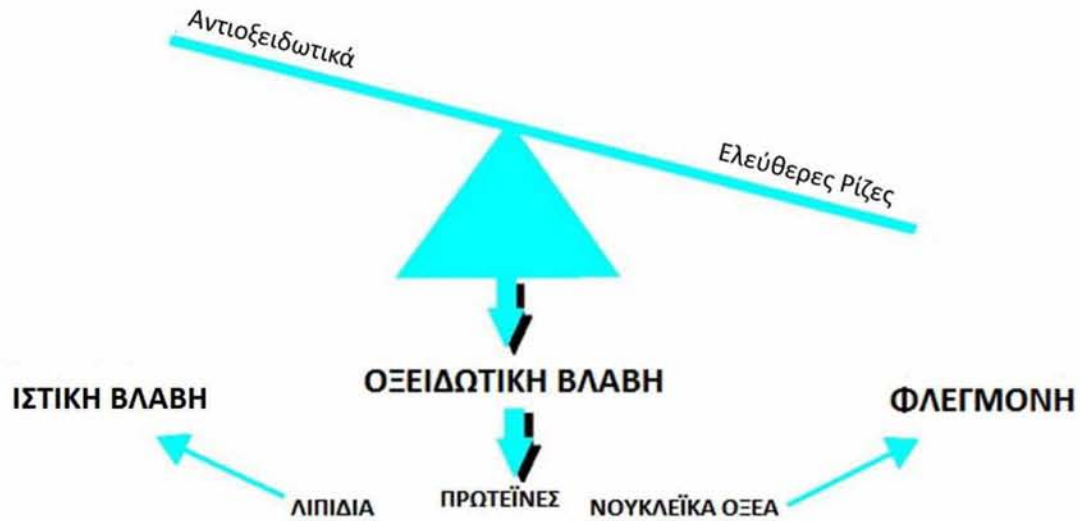
Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 2015).

1.5. Οξειδωτικό στρες

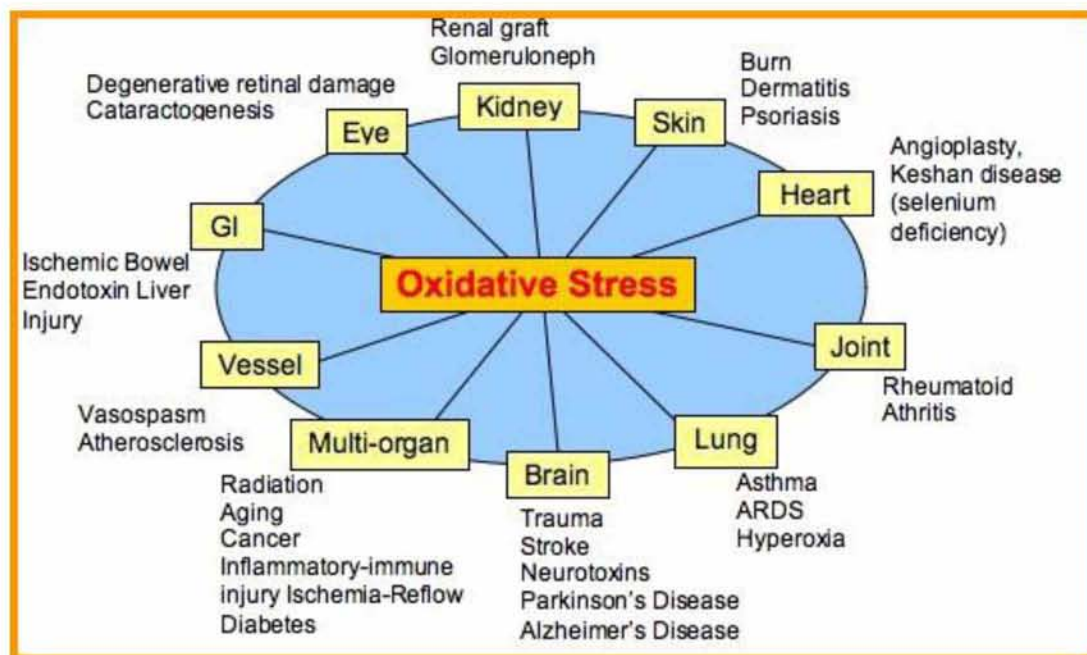
Το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού υπέρ των πρώτων, που ενδεχομένως οδηγεί σε ζημιά-βλάβες (Sies, 1997) (Εικόνα 2). Αυτή η διαταραχή μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών λόγω κάποιων μεταλλάξεων.

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί τόσο από εξωγενείς όσο και από ενδογενείς παράγοντες. Στους εξωγενείς παράγοντες συγκαταλέγονται η περιβαλλοντική ρύπανση (ατμοσφαιρική ρύπανση και ρύπανση υδάτων), ξеноβιοτικές ουσίες, παθογόνα βακτήρια και ιοί, η ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική), καθώς και το κάπνισμα, το αλκοόλ, η κακή και μη ισορροπημένη διατροφή, τα φάρμακα. Στις ενδογενείς πηγές ανήκουν ένζυμα που παράγουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης που μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ) καθώς επίσης και η έντονη άσκηση και το ψυχολογικό στρες. Πάντως, η παραγωγή ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες έχουν σαν αποτέλεσμα την κυτταρική εκφύλιση και εμπλέκονται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες θεωρούνται, κατά ένα μέρος, υπεύθυνες (Halliwell *et al.*, 1992). (Εικόνα 3)



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση παθολογικών καταστάσεων που εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες

1.6. Πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες. (Manach *et al.*, 2004, Στάγκος, 2006).

Κύριες διατροφικές πηγές πολυφαινολών αποτελούν τα φρούτα, ο χυμός φρούτων, το κρασί, το τσάι, ο καφές, η σοκολάτα και η μπίρα. Επίσης διατροφικές πηγές πολυφαινολών αλλά σε μικρότερο βαθμό αποτελούν τα λαχανικά και τα δημητριακά.

1.6.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες που λαμβάνουμε μέσω της διατροφής. Στα φλαβονοειδή συγκαταλέγονται περισσότερες από 8000 ενώσεις. Δρουν στα φυτά ως αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά, φωτοϋποδοχείς και προσδίδουν χρώμα σε αυτά (κίτρινες χρωστικές). Το περισσότερο ενδιαφέρον όμως έχει δοθεί στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και χαρακτηριστικό τους είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβανόλες.

1.6.2. Πολυφαινολικά οξέα

Τα πολυφαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών. Είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή. Βρίσκονται σε όλα τα είδη τροφίμων και είναι σε αφθονία σε δημητριακά, όσπρια, σπορέλαια, φρούτα, λαχανικά, ροφήματα και βότανα. Τα πολυφαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκιναμικά (C6-C3) οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχολικό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι). Τα υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον στο προφίλ των πολυφαινολικών οξέων σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα και τα ενδεχόμενα πλεονεκτήματα στην υγεία. (Qiu et al., 2010).

1.6.3. Στιλβένια

Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της δίαιτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο

αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli και συν., 1998). Η ρεσβερατρόλη έχει βρεθεί ότι εμφανίζει αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, με αποτέλεσμα να λειτουργεί προστατευτικά ως προς τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ωστόσο, η δράση της ρεσβερατρόλης στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη.

1.6.4. Λιγνάνες

Οι λιγνάνες βρίσκονται ευρέως στα αγγειόσπερμα και στα γυμνόσπερμα φυτά. Έχουν μεγάλο εύρος δομών και βιολογικών δραστηριοτήτων. Έχει βρεθεί ότι ποικίλες λιγνάνες έχουν αντικαρκινικές, αντιιικές ιδιότητες. Οι λιγνάνες έχουν μελετηθεί και για τον προστατευτικό τους ρόλο σε καρδιαγγειακές ασθένειες (Chun et al., 2014). Επίσης κάποιες λιγνάνες εξειδικευμένα εμποδίζουν συγκεκριμένα ένζυμα. Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνανών (Adlercreutz and Mazur, 1997).

1.7. *Achillea millefolium*

Η αγριανιθιά ή αλλιώς η αχίλλεα λέγεται και χιλιοφύλλο εξαιτίας των πολλών φυλλάριων των σύνθετών του φύλλων και είναι φυτό συνδεδεμένο με την με την μυθολογία πολλών λαών. Η επίσημη ονομασία του φυτού είναι *Achillea millefolium* και είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Αστεροειδών (Asteraceae) και είναι πολυετής πόα με ύψος που κυμαίνεται από 20 έως 100 εκατοστά. Είναι φυτό το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική πλαστικότητα και προσαρμοστικότητα σε πολλά κλίματα και σε πολλά εδάφη. Πολλαπλασιάζεται με σπόρο και παραφυάδες και είναι ένα από τα πιο ανθεκτικά φυτά σε εχθρούς και ασθένειες.

Η δρόγη της αχίλλεας περιέχει φλαβονοειδή, ταννίνες, κουμαρίνες και προαζουλένιο. Το αιθέριο έλαιό της περιέχει διάφορες ουσίες και έχει αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή και εντομοαπωθητική δράση. Χρησιμοποιείται από φαρμακοβιομηχανίες για αλοιφές και σαπούνια και από στη Σουηδία χρησιμοποιείται

για την Παρασκευή ειδικής μύρας. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αχίλλεα όταν αναπτύσσεται σε μολυσμένο έδαφος ή όταν η ατμόσφαιρα είναι μολυσμένη συγκεντρώνει πολλά βαρέα μέταλλα για αυτό η συλλογή αυτοφυών φυτών θα πρέπει να γίνεται με προσοχή.



Εικόνες 4,5. *Achillea millefolium*

1.8. *Anthemis* sp.

Το φυτό ανθεμίδα είναι διεθνώς γνωστό ως Ρωμαϊκό χαμομήλι ή κοινό χαμομήλι. Δεν θα πρέπει να συγχέεται με το φυτό που στην Ελλάδα ονομάζουμε χαμομήλι αν και τα δύο φυτά ανήκουν στην ίδια οικογένεια και μοιάζουν στα φύλλα και στα άνθη. Η ανθεμίδα ανήκει στην οικογένεια των Αστεροειδών (Asteraceae) της τάξης των Asterales. Είναι πολυετής πόα και τα ανθοφόρα στελέχη της φθάνουν τα 20-25 εκατοστά ύψος. Σύμφωνα με τον Καββαδά στον Ελλαδικό χώρο αυτοφύονται 22 είδη ανθεμίδας. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι τα εξής:

- *A. tinctoria* L.
- *A. cotula* L.
- *A. arvensis* L.
- *A. tomentoza* L.

Η ανθεμίδα είναι φυτό που ευδοκimeί σε εύκρατα κλίματα και σε γόνιμα και πλούσια σε οργανική ουσία εδάφη. Η ανθεμίδα είναι αρωματικό, φαρμακευτικό, αρτυματικό και καλλωπιστικό φυτό. Αφεψήματα της δρόγης χρησιμοποιούνται ενάντια στη δυσπεψία ενώ το αιθέριο έλαιο χρησιμοποιείται στην αρωματοθεραπεία και την κοσμετολογία. Σε κάποιες χώρες της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης χρησιμοποιείται και για την παρασκευή μύρας.



Εικόνα 6. *Anthemis sp.*

1.9. *Coriander sativum*

Το φυτό με την επιστημονική ονομασία *Coriander sativum* είναι ο κορίανδρος, ο οποίος στη χώρα μας είναι γνωστός και με το όνομα κόλιαντρος. Είναι φυτό της οικογένειας των Σκιαδανθών (Ariaceae) της τάξης των Araliales. Είναι μονοετής πόα με ύψος που κυμαίνεται μεταξύ 30 και 60 εκατοστά. Αναπτύσσεται σε εύκρατα και ηπειρωτικά κλίματα. Χρησιμοποιείται αρτυματικά κυρίως σε σαλάτες αλλά και σε άλλα φαγητά. Επίσης χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων. Το αιθέριο έλαιό του έχει αντιβακτηριακή δράση και χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και σαπουνοποιία.



Εικόνες 7,8. *Coriander sativum*

1.10. *Helleborus cyclophyllus*

Οι ελλέβοροι είναι φυτά ποώδη με πολυετές ρίζωμα που φύονται κυρίως στα ορεινά. Υπάρχουν 11 είδη ελλέβορου σε όλη την Ευρώπη, όμως στην Ελλάδα φυτρώνει μόνο ένα, ο ελλέβορος ο κυκλόφυλλος (*Helleborus cyclophyllus*) ο οποίος είναι κοινά γνωστός ως σκάρπι. Ο ελλέβορος ο κυκλόφυλλος είναι πολυετής πόα ύψους έως 30 εκατοστά και ανήκει στην οικογένεια των Ρανουγκουλίδων (*Ranunculaceae*). Είναι φυτό δηλητηριώδες και από την αρχαιότητα το χρησιμοποιούσαν στην φαρμακευτική για θεραπευτικούς σκοπούς.



Εικόνες 9,10. *Helleborus cyclophyllus*

1.11. *Mentha spicata*

Ο δυόσμος (*Mentha spicata*) ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (*Lamiaceae*). Είναι πολυετής πόα με ύψος έως 70 εκατοστά και μοιάζει πολύ με τη μέντα. Η πιο χαρακτηριστική διαφορά ανάμεσα στον δυόσμο και στην μέντα είναι το χρώμα του βλαστού. Στον δυόσμο το χρώμα του βλαστού είναι πράσινο ενώ στη μέντα είναι σκούρο ιώδες. Ο δυόσμος χρησιμοποιείται κυρίως στη μαγειρική. Τα φύλλα του χρησιμοποιούνται σε διάφορα φαγητά και χρησιμοποιούνται και αρκετά σε σάλτσες και σαλάτες. Επίσης το αιθέριο έλαιό του χρησιμοποιείται από τις βιομηχανίες τροφίμων και αρωματοποιίας.



Εικόνες 11,12. *Mentha spicata*

1.12. *Oropanax chironium*

Το φυτό *Oropanax chironium* ανήκει στην οικογένεια των Αριaceae και πρόκειται για μια πολυετή πόα που φθάνει σε ύψος περίπου 1 μέτρο και έχει κίτρινα άνθη. Το όνομά του γένους (*Oropanax*) προέρχεται από τις λέξεις: οπός(= χυμός) + παν (= όλα) + ακέομαι (= θεραπεύω) , δηλαδή ο χυμός που θεραπεύει τα πάντα. Χρησιμοποιείται στη μαγειρική, σε κάποιες περιοχές της Ελλάδας τρώγεται ως λαχανικό και επίσης χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική.



Εικόνες 13,14. *Oropanax chironium*

1.13. *Origanum onites*

Το γένος *Origanum* περιλαμβάνει πολλά είδη, υποείδη και ποικιλίες που αναπτύσσονται σε όλες σχεδόν τις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο αλλά και στις εύκρατες ζώνες της Ασίας και Αμερικής. Το φυτό *Origanum onites* στη χώρα μας

λέγεται νησιωτική ρίγανη ενώ διεθνώς είναι γνωστή ως Turkish oregano. Η νησιωτική ρίγανη είναι φυτό της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae) της τάξης των Lamiales και είναι πολυετές φρύγανο με όρθιους, τριχωτούς βλαστούς, με έρπον ριζικό σύστημα και το ύψος του φτάνει μέχρι 70 εκατοστά. Η δρόγη και το αιθέριο έλαιο της νησιωτικής ρίγανης αλλά και της κοινής ρίγανης έχουν αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες. Η ξηρή δρόγη χρησιμοποιείται κυρίως αρτυματικά σε φαγητά αλλά και ως αβλαβές συντηρητικό. Το αιθέριο έλαιο αντίστοιχα χρησιμοποιείται στα σιτηρέσια ζώων βιολογικής εκτροφής για να αντικαταστήσει διάφορα αντιβιοτικά.



Εικόνες 15,16. *Origanum onites*

1.14. *Psoralea bituminosa*

Το φυτό *bituminaria bituminosa* (συνώνυμο: *Psoralea bituminosa*) είναι κοινώς γνωστό ως Πισόχορτο, Βρωμόχορτο, Τρίφυλλον και απαντά σε πολλές περιοχές της Ελλάδας αλλά και σε πολλές περιοχές γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου. Είναι πολυετές αυτοφυές φυτό της οικογένειας Fabaceae. Είναι χνουδωτό με ξυλώδεις βλαστούς στη βάση του και έχει χαρακτηριστική οσμή πίσσας. Το ύψος του κυμαίνεται από 20 εκατοστά έως 1 μέτρο. Χρησιμοποιείται κυρίως στη φαρμακευτική και στην εναλλακτική ιατρική. Στην Κίνα και στην Ιαπωνία είναι ένα από τα κύρια βότανα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση παθήσεων του δέρματος. Επίσης χρησιμοποιείται και ως σιτηρέσιο για ζώα επειδή έχει καλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αφού όμως πρώτα έχει ξηρανθεί και χάσει τη δυσάρεστη οσμή πίσσας.



Εικόνα 17. *Psoralea bituminosa*

1.15. *Senecio eubaeus*

Το *Senecio eubaeus* είναι φυτό της οικογένειας των Asteraceae (Compositae). Εντοπίζεται μόνο στην περιοχή της Εύβοιας και κυρίως στο βουνό Δίρφυ.



Εικόνες 18,19,20. *Senecio eubaeus*

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα είδη φυτών *Achillea millefolium*, *Anthemis sp.*, *Coriander sativum*, *Helleborus cyclophyllus*, *Mentha spicata*, *Oropanax chironium*, *Origanum onites*, *Psoralea bituminosa*, *Senecio eubaeus*.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών: η ρίζα DPPH, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το H_2O_2 (υπεροξειδίο του υδρογόνου) και το ένζυμο HRP ήταν της εταιρίας Merck (Γερμανία). Το γαλλικό οξύ (gallic acid), το ABTS και το άνυδρο ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) ήταν της εταιρείας Alpha Aesar (Γερμανία).

3.2. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα τα οποία μελετήθηκαν απομονώθηκαν από τα φυτά *Achillea millefolium* (οικογένεια Asteraceae), *Anthemis sp.* (οικογένεια Asteraceae), *Coriander sativum* (οικογένεια Apiaceae), *Helleborus cyclophyllus* (οικογένεια Ranunculaceae), *Mentha spicata* (οικογένεια Lamiaceae), *Oropanax chironium* (οικογένεια Apiaceae), *Origanum onites* (οικογένεια Lamiaceae), *Psoralea bituminosa* (οικογένεια Fabaceae) και *Senecio eubaeus* (οικογένεια Asteraceae). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη και νερό. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πίνακας 1. Λίστα φυτικών εκχυλισμάτων

Φυτό	Διαλύτης	Κωδικός
<i>Achillea millefolium</i>	Μεθανόλη	85 Exc
<i>Anthemis sp.</i>	Μεθανόλη	79 Exc
<i>Coriander sativum</i>	Μεθανόλη	55 Exc
<i>Helleborus cyclophyllus</i>	Μεθανόλη	74 Exc
<i>Mentha spicata</i>	Μεθανόλη	56 Exc
<i>Oropanax chironium</i>	Μεθανόλη	91 Exc
<i>Origanum onites</i>	Νερό	131 Exd
<i>Psoralea bituminosa</i>	Μεθανόλη	94 Exc
<i>Senecio eubaeus</i>	Μεθανόλη	75 Exc

3.3. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•

Η συγκεκριμένη μέθοδος ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η ρίζα DPPH• έχει χαρακτηριστικό μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Η ρίζα DPPH• είναι μία σταθερή ρίζα που όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε αυτή ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Αποτέλεσμα της αναγωγής της ρίζας είναι η μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μια μεταβολή που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

3.3.1. Πειραματική διαδικασία

Η αρχή γίνεται με την προετοιμασία του διαλύματος DPPH[•] την ημέρα του πειράματος. Το διάλυμα αυτό καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στα οποία εμπεριέχονται 50 μM ρίζας DPPH[•]). Έπειτα ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Σε eppendorf tubes (πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorf) των 1,5 ml γίνεται η προσθήκη των διαλυμάτων με την ακόλουθη σειρά. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, στη συνέχεια η μεθανόλη και το H₂O και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων.

Πίνακας 2 .Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control ⁺	Control ⁻	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
Εκχύλισμα	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Μεθανόλη	900μl	850μl	900μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl	850μl
H₂O	100μl	100μl	-	-	-	-	-	-	-
DPPH[•]	-	50μl	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Τελικός Όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Ακολουθεί ανάδευση (κατά προτίμηση σε vortex) και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας των 20 λεπτών ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Το τυφλό χρησιμοποιείται για το μηδενισμό του φωτομέτρου. Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη, νερό και τη ρίζα DPPH αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες (Control⁺) ενώ τα δείγματα που περιείχαν μόνο το εκχύλισμα και τη μεθανόλη αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες (Control⁻). Η μέτρηση της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα γίνεται επειδή υπάρχει η πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm. Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα.

3.3.2. Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_s : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλείται μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Ο υπολογισμός των τιμών IC₅₀ έγινε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 6.

3.4. Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα ABTS•+

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonicacid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (κατιόν). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε

να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Prior et al., 2005, Miller et al., 1993).

3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

- Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μ l) παρασκευάζεται διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος αρχικά ζυγίζονται 10.97 mg ABTS και έπειτα διαλύονται σε H_2O .
- Διάλυμα H_2O_2 (30 μ M): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μ M σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μ l) παρασκευάζεται διάλυμα 600 μ M. Πραγματοποιείται αραίωση του stock διαλύματος H_2O_2 30% 8,8 M με H_2O , ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα των 600 μ M.
- Διάλυμα HRP (6 μ M): Διαλύεται 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια αραίωση 1/10 και χρησιμοποιείται αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1100 μ l στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP) σε eppendorf tubes είτε του 1,5 είτε των 2 mL. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	C ⁺	C ⁻	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
H ₂ O	550μl	500μl	450μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl	400μl
ABTS	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl	500μl
H ₂ O ₂	100μl	50μl	50μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
HRP	-	50μl	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Εκχύλισμα	-	-	100μl	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Τελικός Όγκος	1100 μl	1100μl	1100 μl	1100 μl	1100 μl	1100 μl	1100 μl	1100 μl	1100 μl

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα. Μετά την επώση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου.(Control)

3.4.2. Υπολογισμός της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας-Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3.5. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (Total Phenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινολών των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3), αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης.

3.5.1. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) την ημέρα του πειράματος. Στη συνέχεια σε eppendorf tubes προστίθενται διαδοχικά νερό, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το εκχύλισμα. Η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

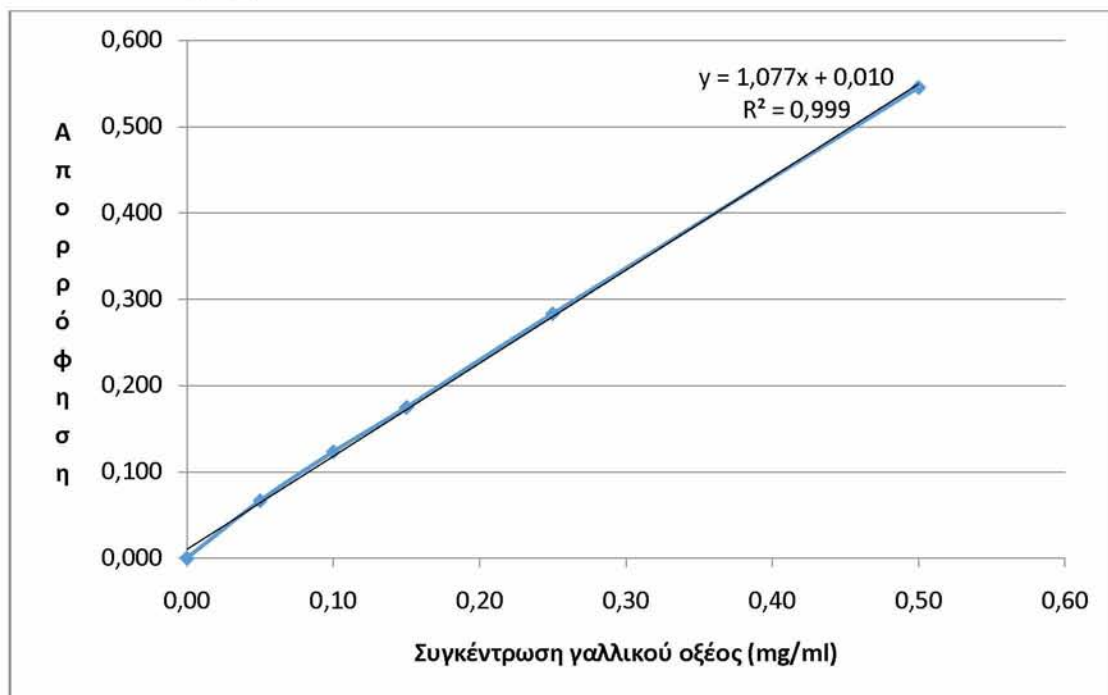
Πίνακας 4.Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Negative control	C ₁
H ₂ O	1,02ml	1,1ml	1ml
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	100μl	-	100μl
Εκχύλισμα	-	20μl	20μl

Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μίγμα προστίθενται 280μl Na_2CO_3 (25% w/v) και 600μl απιονισμένο νερό και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετράται η απορρόφηση στα 765nm (Priftis et al., 2015).

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων πραγματοποιείται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος

των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,5mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 1,0777x + 0,0101$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $R^2=0,999$. Το συνολικό πολυφαινόλικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.

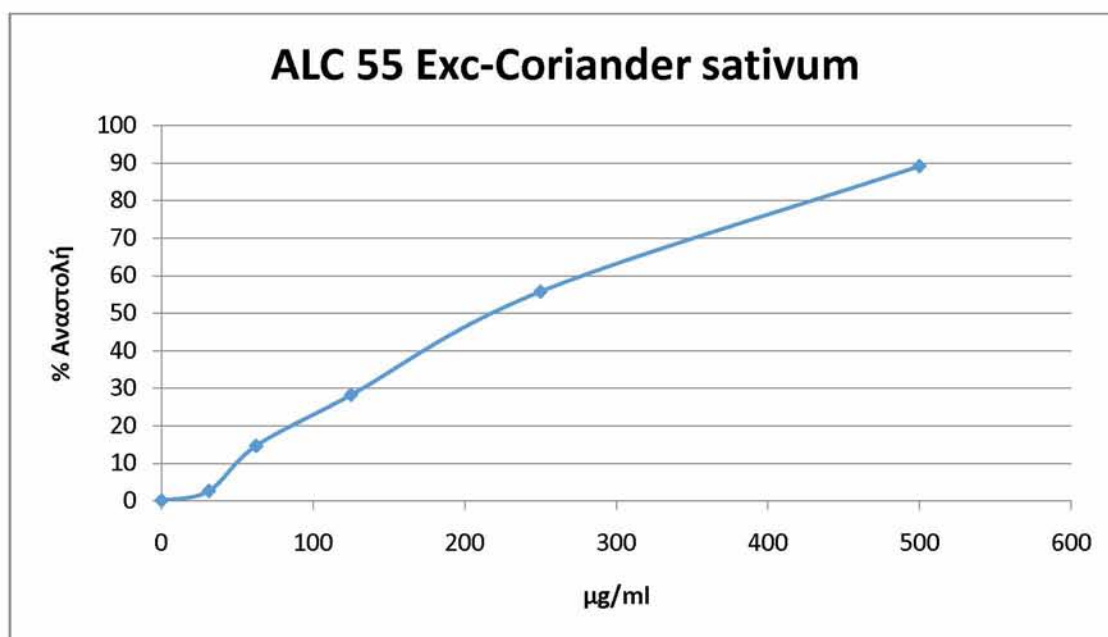


Διάγραμμα 1 .Το διάγραμμα απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

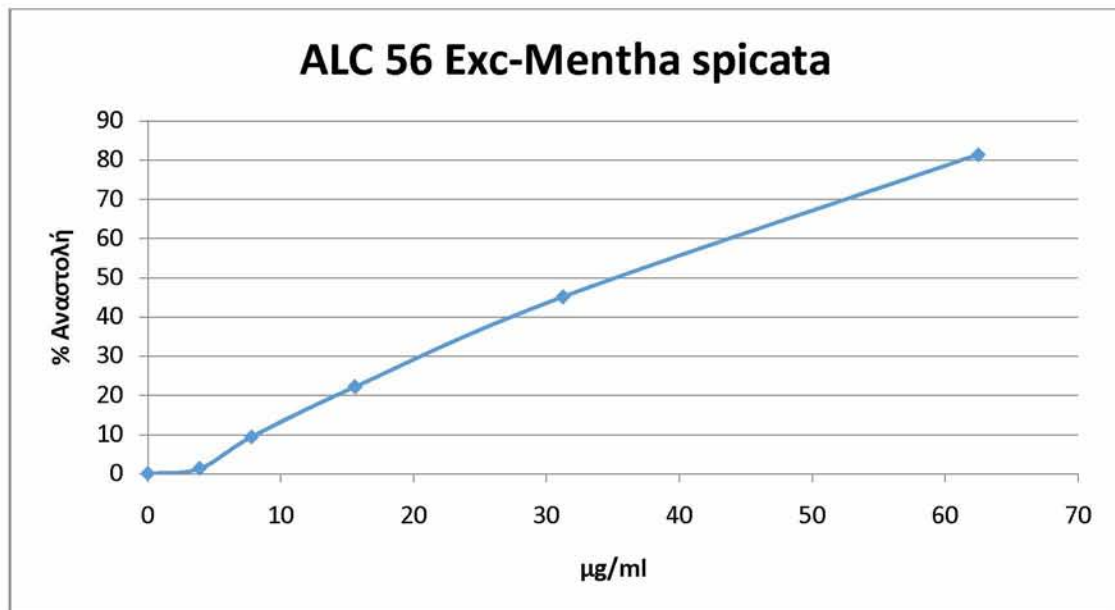
4. Αποτελέσματα Μετρήσεων

4.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH

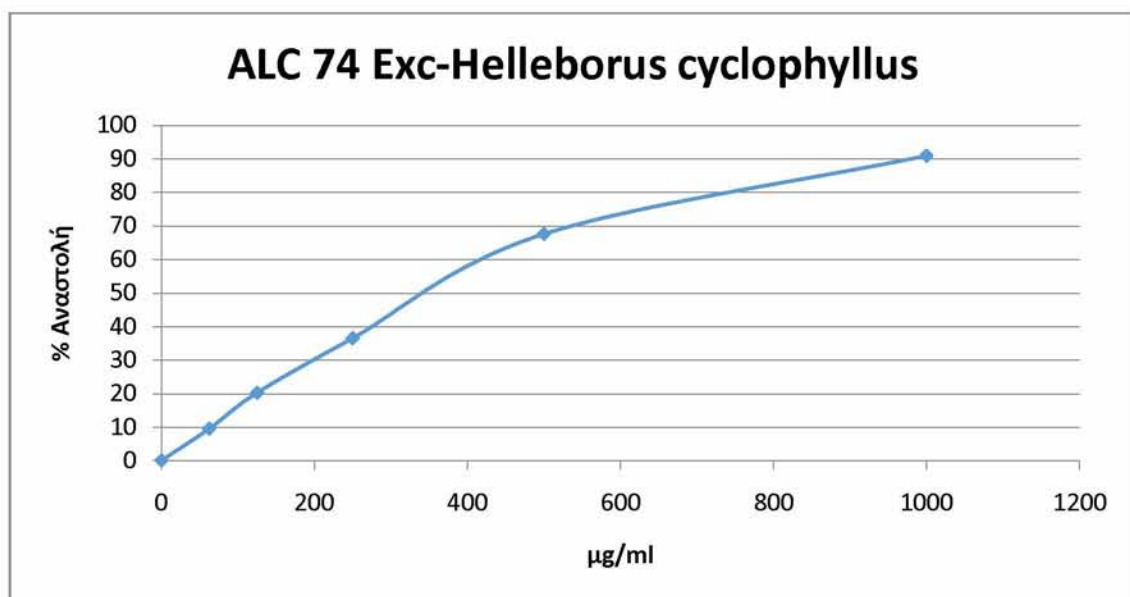
Συνολικά μελετήθηκαν 9 εκχυλίσματα από τα φυτά *Achillea millefolium*, *Anthemis* sp., *Coriander sativum*, *Helleborus cyclophyllus*, *Mentha spicata*, *Oporanax chironium*, *Origanum onites*, *Psoralea bituminosa*, *Senecio eubaeus* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις από 2,5-1000μg/ml ανάλογα με το πόσο ισχυρό ήταν το κάθε εκχύλισμα. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δοσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH*, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο διάγραμμα 4.1. και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ υπολογίστηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 6 και κυμαίνονται από **25,78μg/ml** έως **317,2μg/ml** (διάγραμμα 4.1.10). Πιο συγκεκριμένα η σειρά δραστηκότητας των εκχυλισμάτων είναι η ακόλουθη: ALC 131 Exd (**IC₅₀=25,78μg/ml**)>ALC 56 Exc (**IC₅₀=31,91μg/ml**)>ALC 85 Exc (**IC₅₀=48,31μg/ml**)>ALC 79 Exc (**IC₅₀=59,85μg/ml**)>ALC 94 Exc (**IC₅₀=142,4μg/ml**)>ALC 55 Exc (**IC₅₀=203,3μg/ml**)>ALC 75 Exc (**IC₅₀=241,1μg/ml**)>ALC 91 Exc (**IC₅₀=313μg/ml**)>ALC 74 Exc (**IC₅₀=317,2μg/ml**).



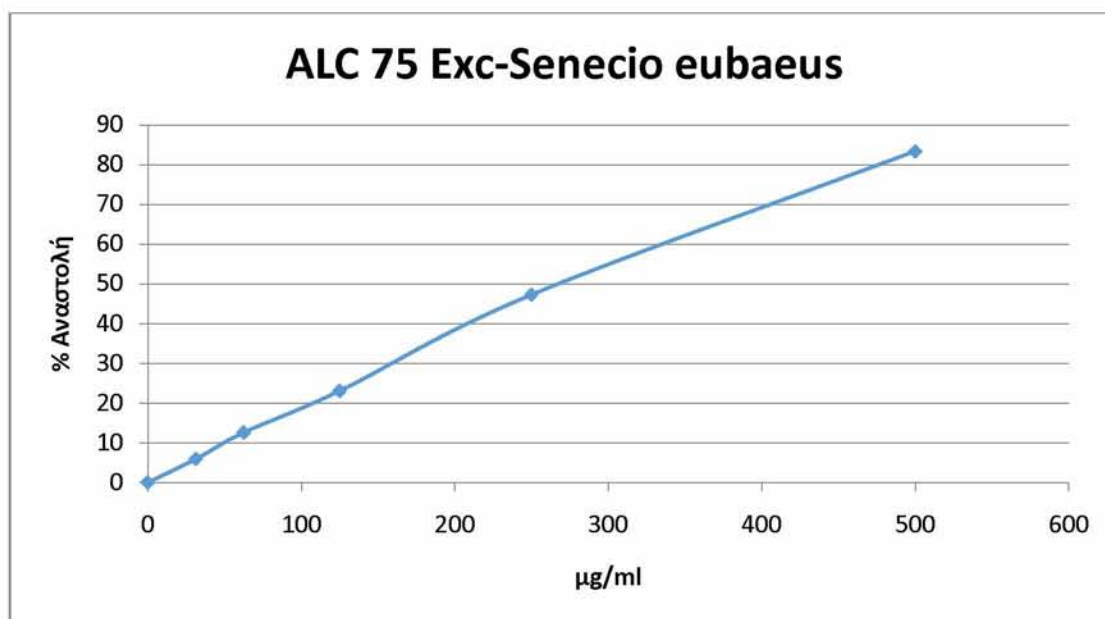
Διάγραμμα 4.1.1. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 55 Exc (*Coriander sativum*).



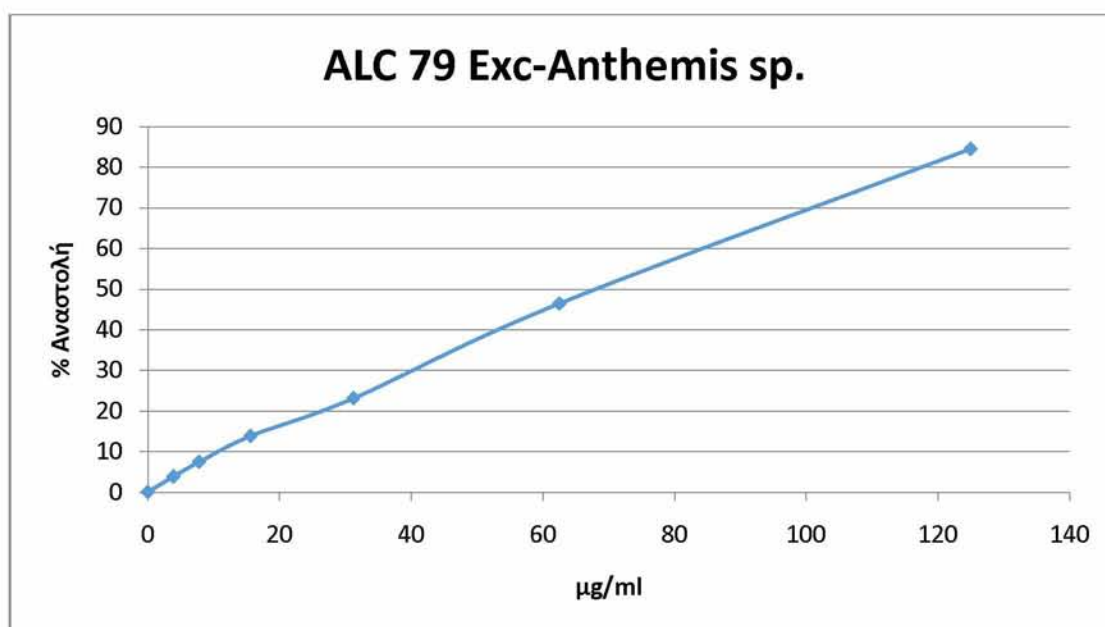
Διάγραμμα 4.1.2. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 56 Exc (*Mentha spicata*).



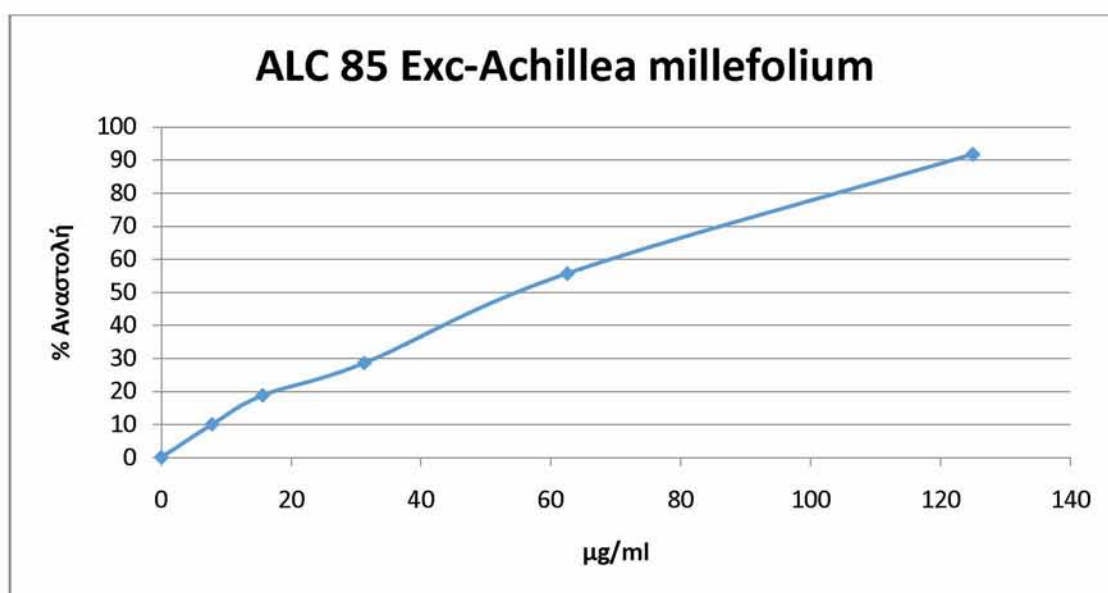
Διάγραμμα 4.1.3. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 74 Exc (*Helleborus cyclophyllus*).



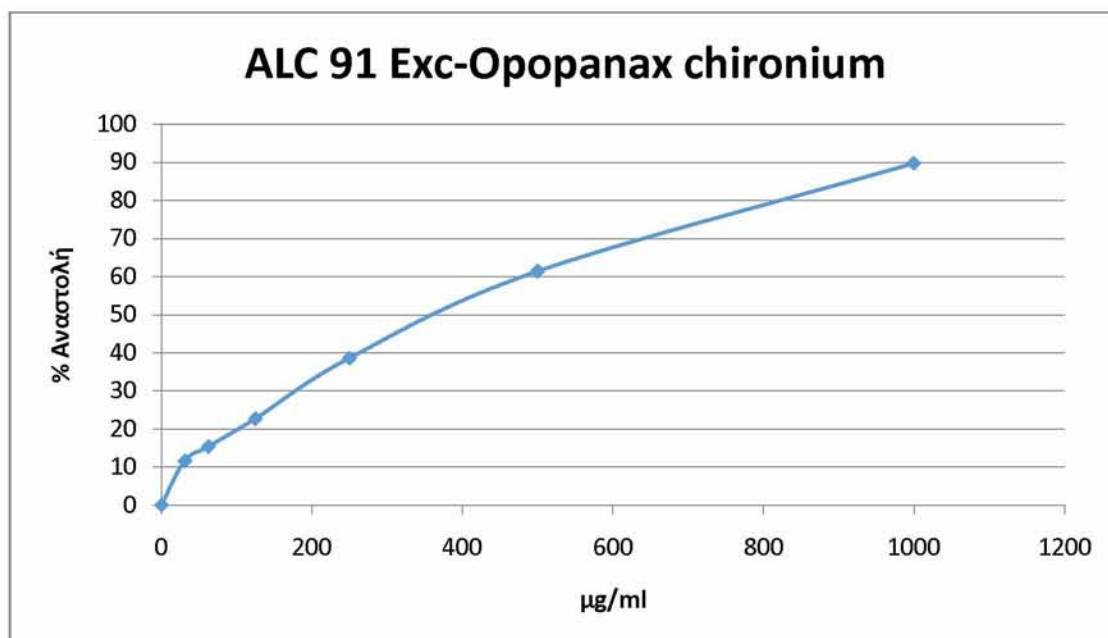
Διάγραμμα 4.1.4. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 75 Exc (*Senecio eubaeus*).



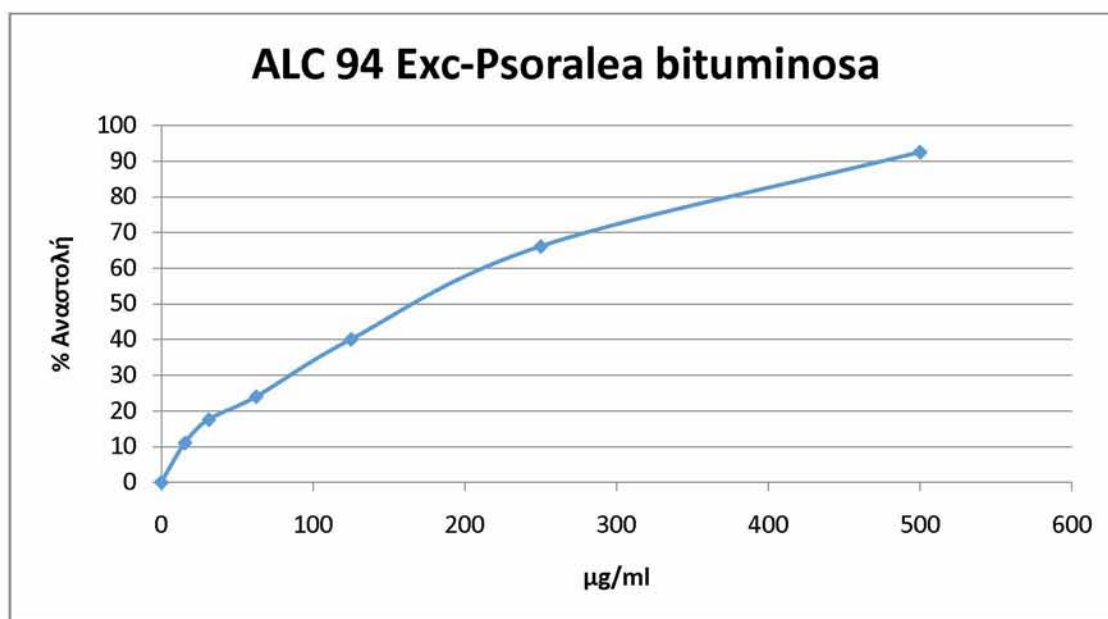
Διάγραμμα 4.1.5. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 79 Exc (*Anthemis sp.*).



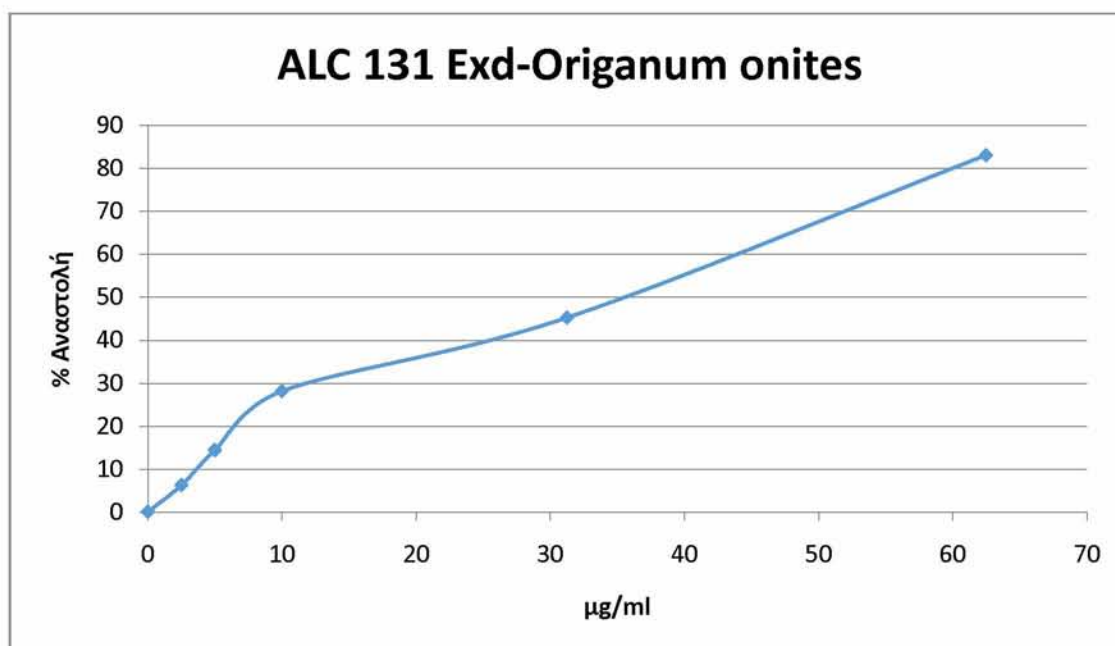
Διάγραμμα 4.1.6. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 85 Exc (*Achillea millefolium*).



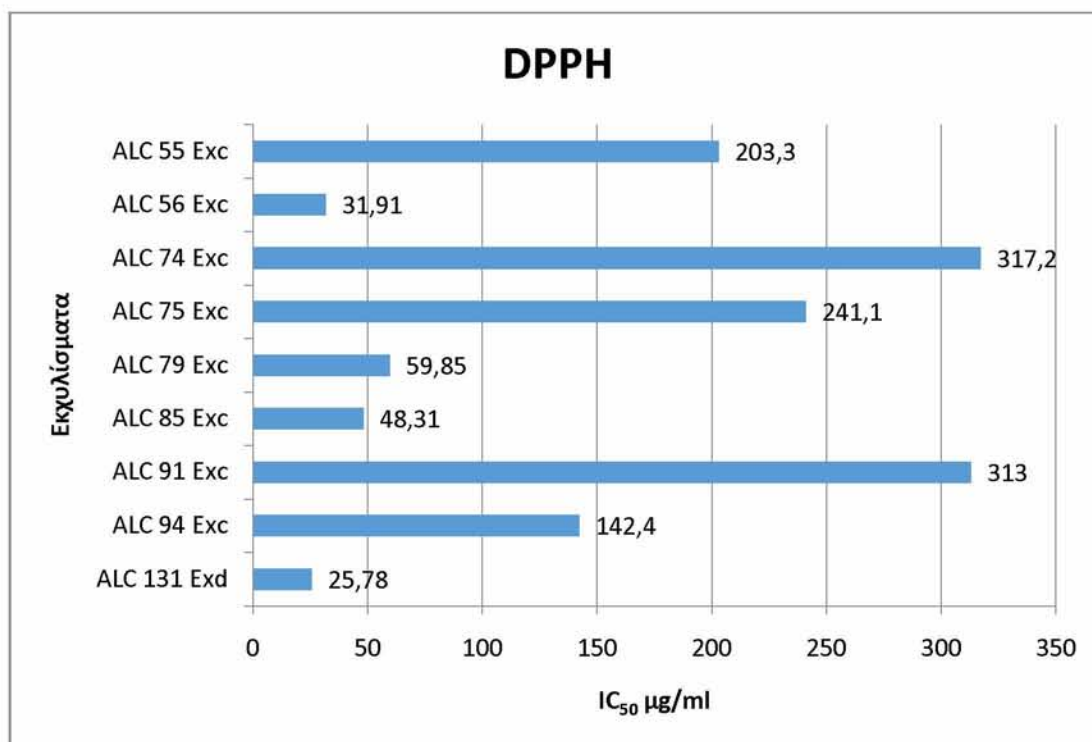
Διάγραμμα 4.1.7. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 91 Exc (*Oropanax chironium*).



Διάγραμμα 4.1.8. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 94 Exc (*Psoralea bituminosa*).



Διάγραμμα 4.1.9. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα ALC 131 Exd (*Origanum onites*).

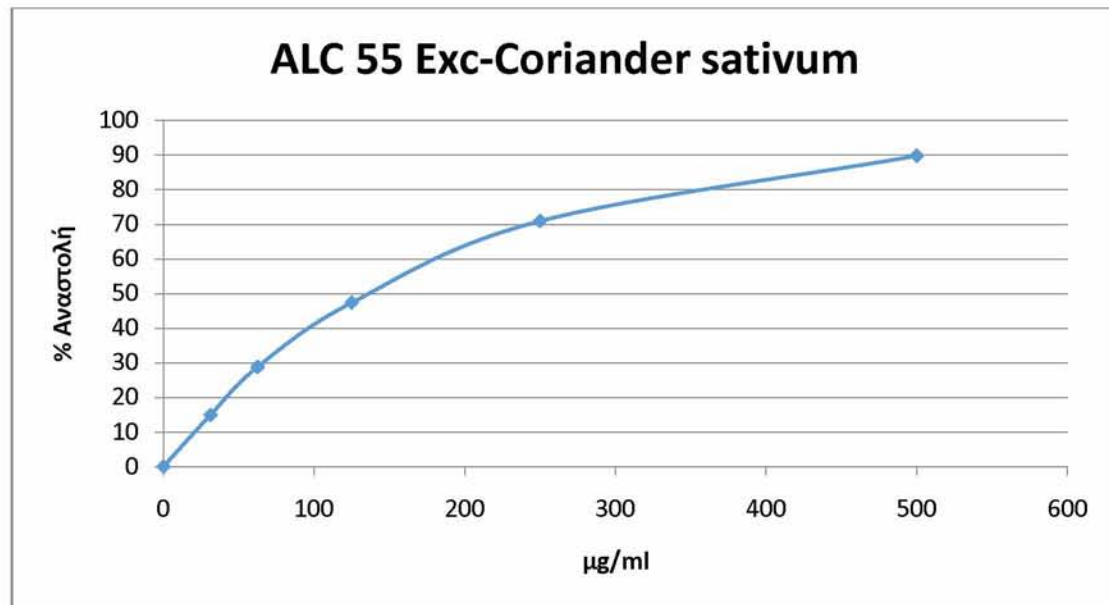


Διάγραμμα 4.1.10. Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα.

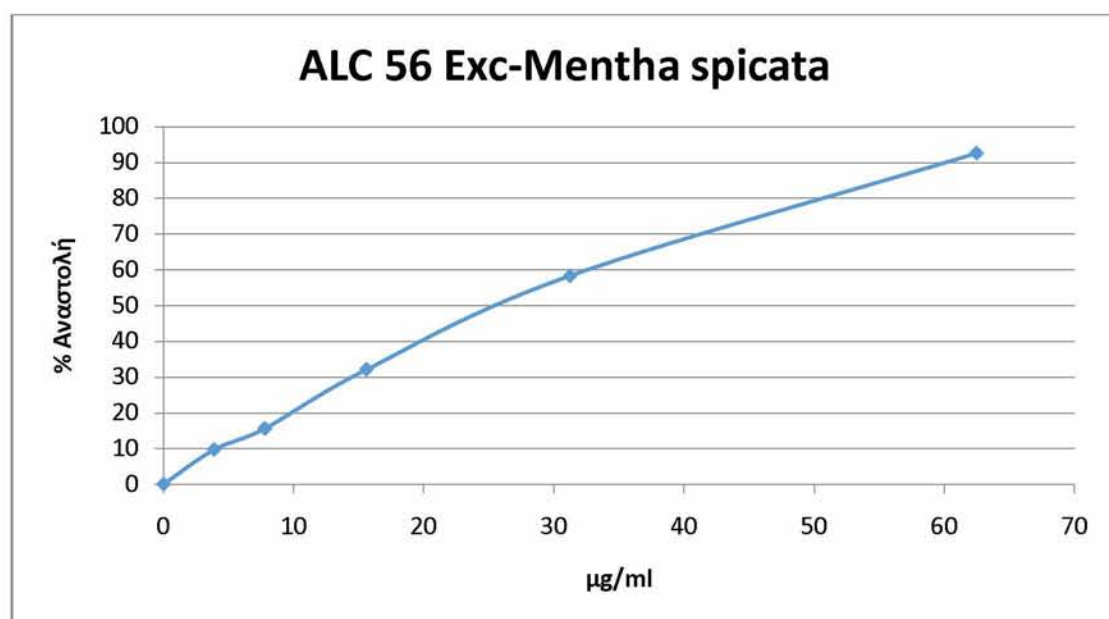
4.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+

Συνολικά μελετήθηκαν 9 εκχυλίσματα από τα φυτά *Achillea millefolium*, *Anthemis sp.*, *Coriander sativum*, *Helleborus cyclophyllus*, *Mentha spicata*, *Oropanax chironium*, *Origanum onites*, *Psoralea bituminosa*, *Senecio eubaeus* και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις από 1,95-1000μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος ABTS στα 730nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}, δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 4.2. και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ υπολογίστηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism 6 και κυμαίνονται από **21,51μg/ml** έως **265,7μg/ml** (διάγραμμα 4.2.). Ειδικότερα η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων είναι η ακόλουθη: ALC 131 Exd (IC₅₀=21,51μg/ml)>ALC 56 Exc (IC₅₀=23,06μg/ml)>ALC

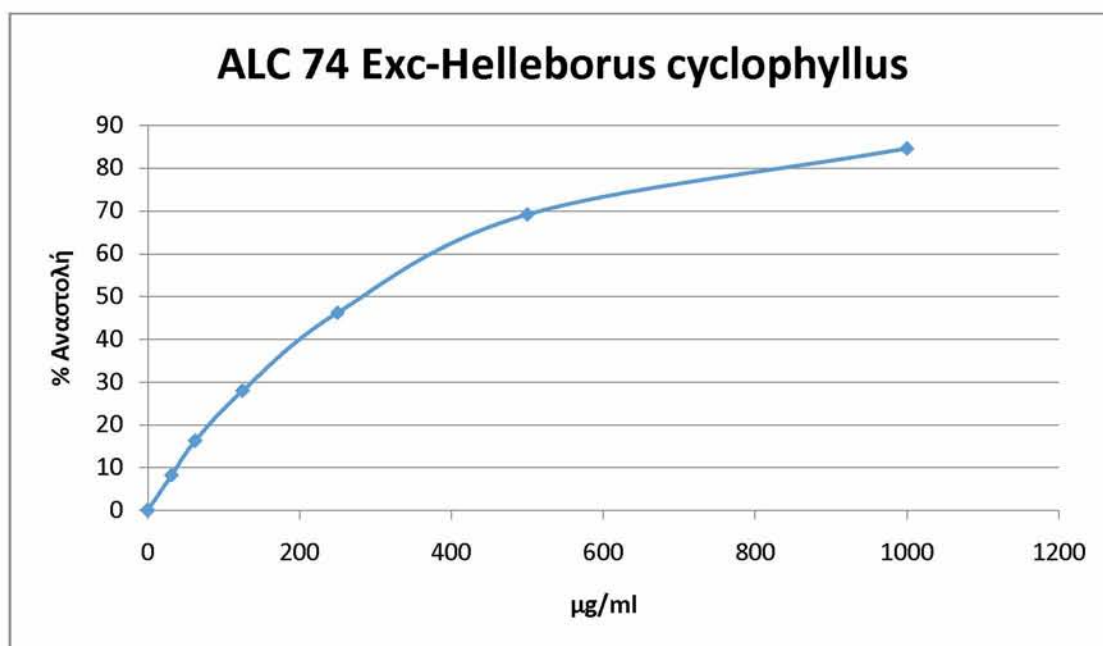
85 Exc ($IC_{50}=35,11\mu g/ml$)>ALC 79 Exc ($IC_{50}=44,63\mu g/ml$)>ALC 94 Exc
 ($IC_{50}=122,5\mu g/ml$)>ALC55 Exc ($IC_{50}=126,2\mu g/ml$)>ALC 75 Exc
 ($IC_{50}=157,5\mu g/ml$)>ALC 91 Exc ($IC_{50}=188,6\mu g/ml$)>ALC 74 Exc
 ($IC_{50}=265,7\mu g/ml$).



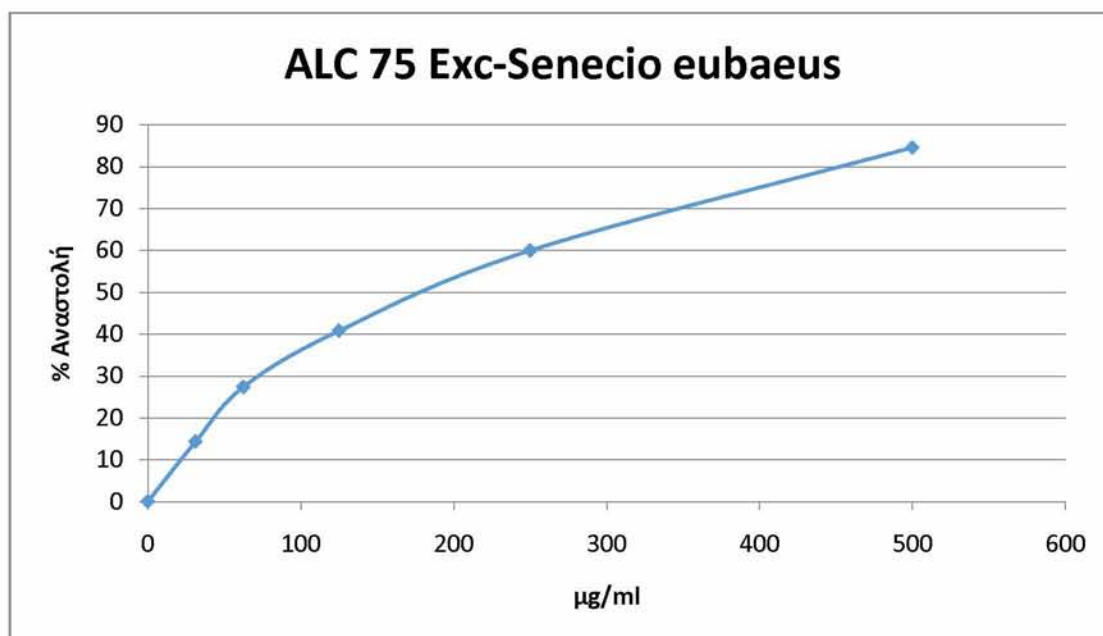
Διάγραμμα 4.2.1. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 55 Exc (*Coriander sativum*).



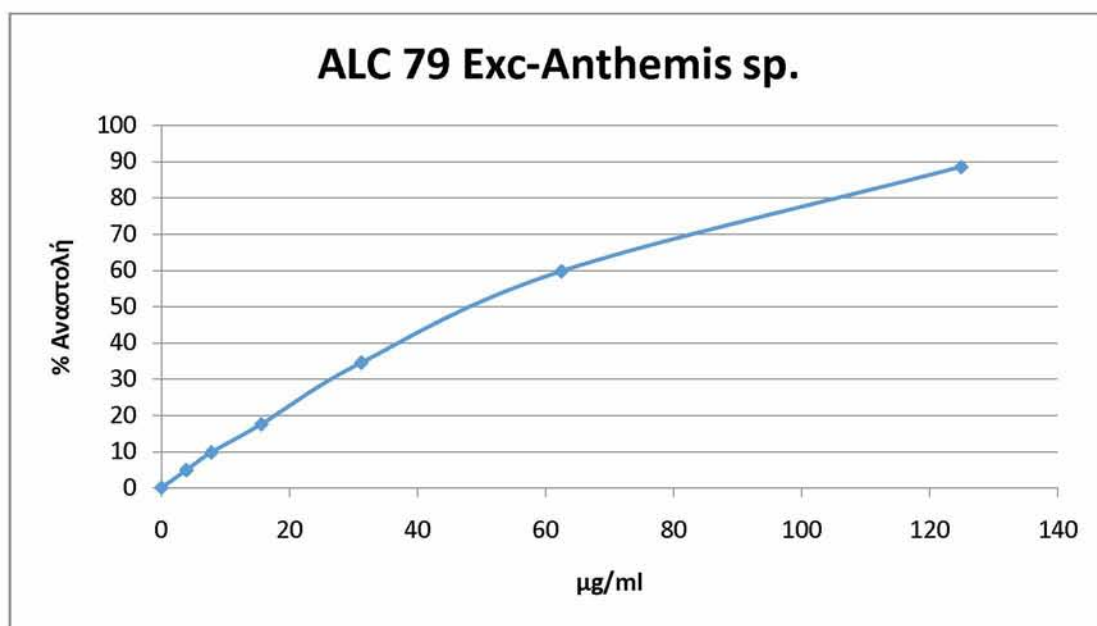
Διάγραμμα 4.2.2. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 56 Exc (*Mentha spicata*).



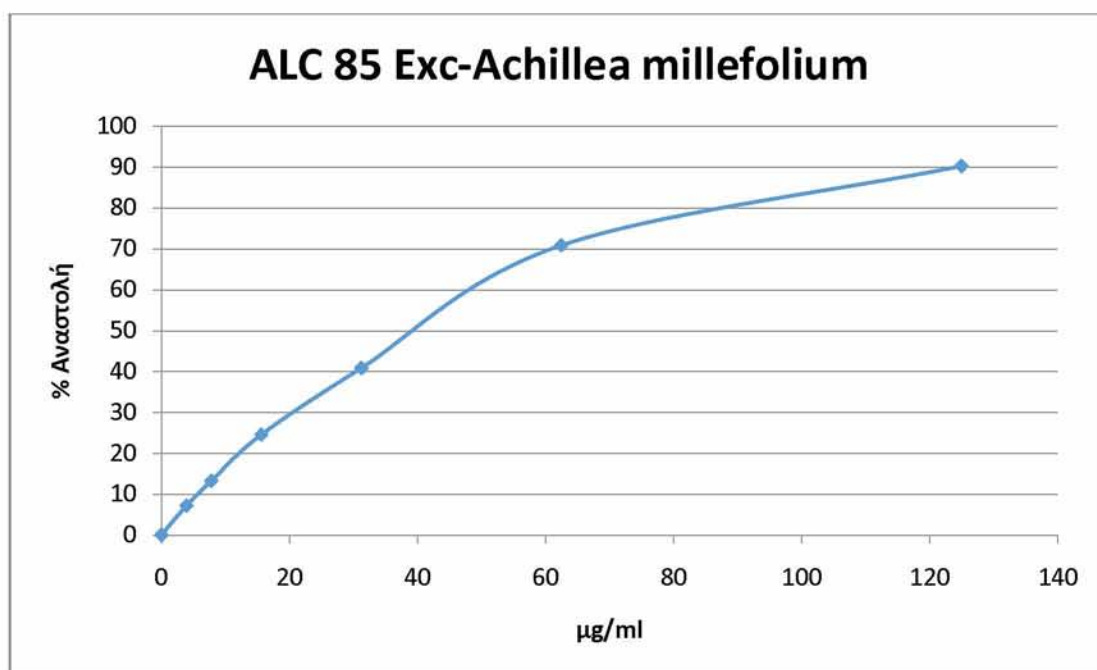
Διάγραμμα 4.2.3. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 74 Exc (*Helleborus cyclophyllus*).



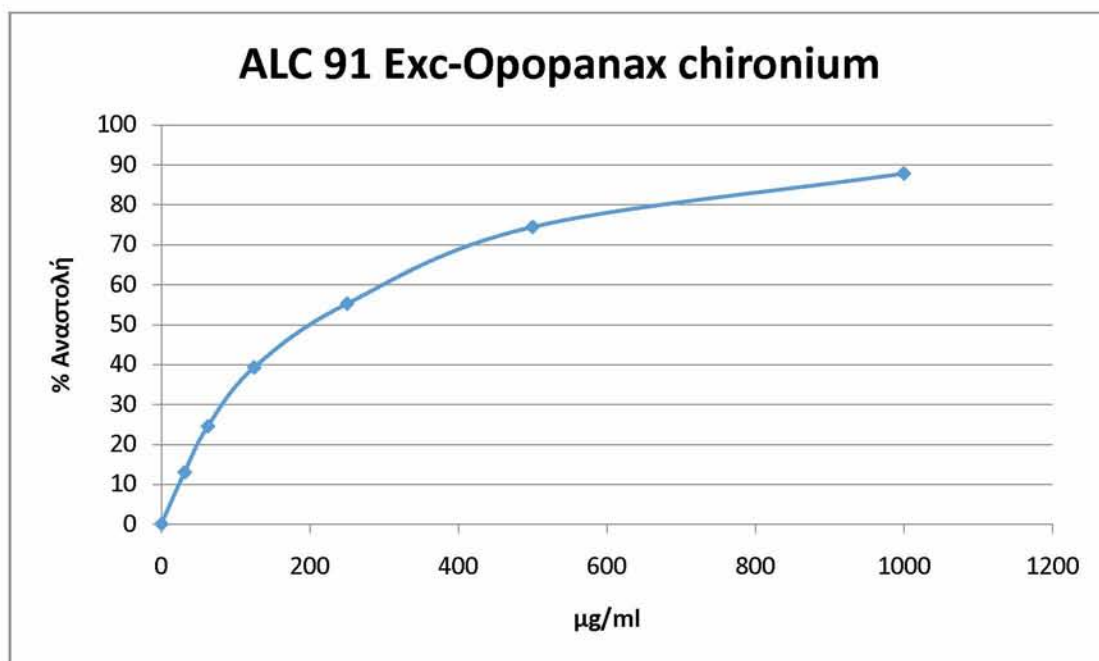
Διάγραμμα 4.2.4. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 75 Exc (*Senecio eubaeus*).



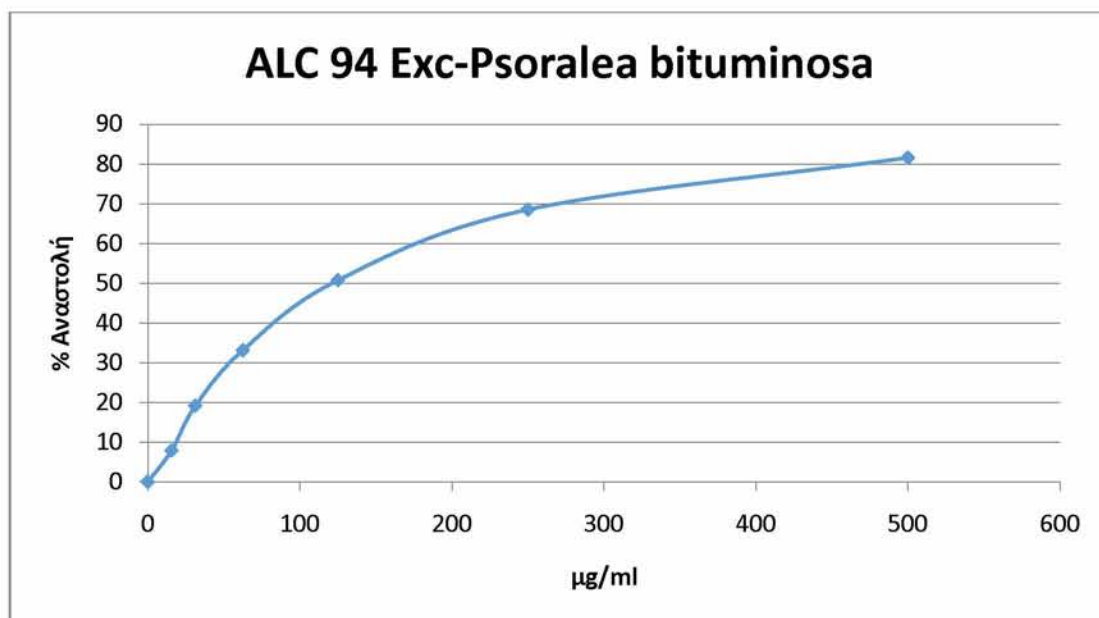
Διάγραμμα 4.2.5. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 79 Exc (*Anthemis sp.*).



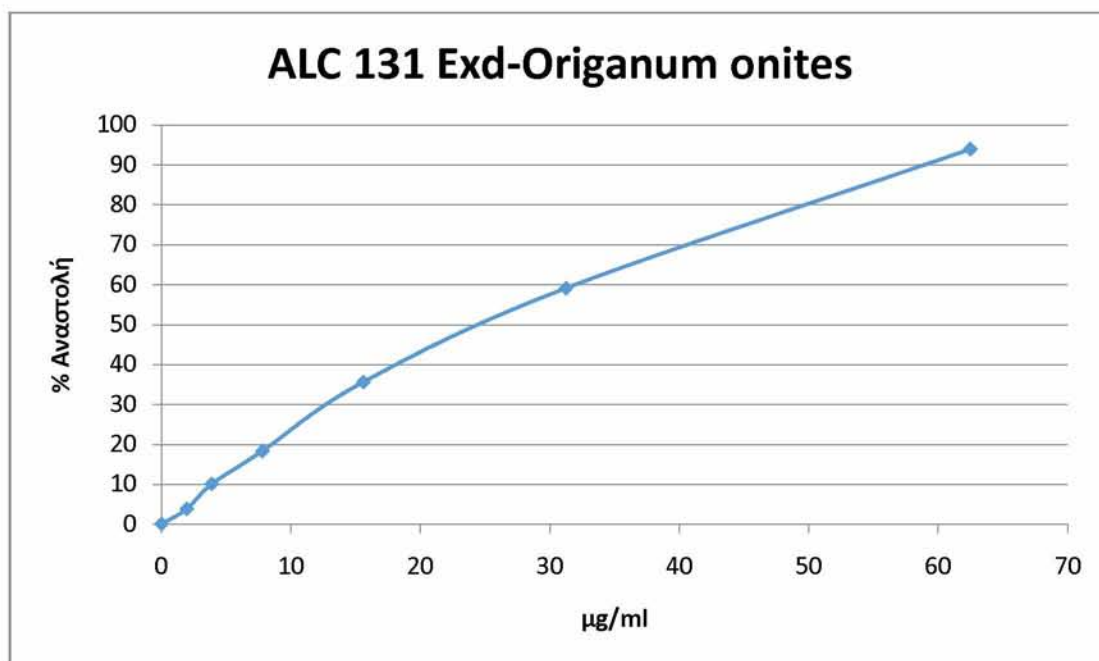
Διάγραμμα 4.2.6. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 85 Exc (*Achillea millefolium*).



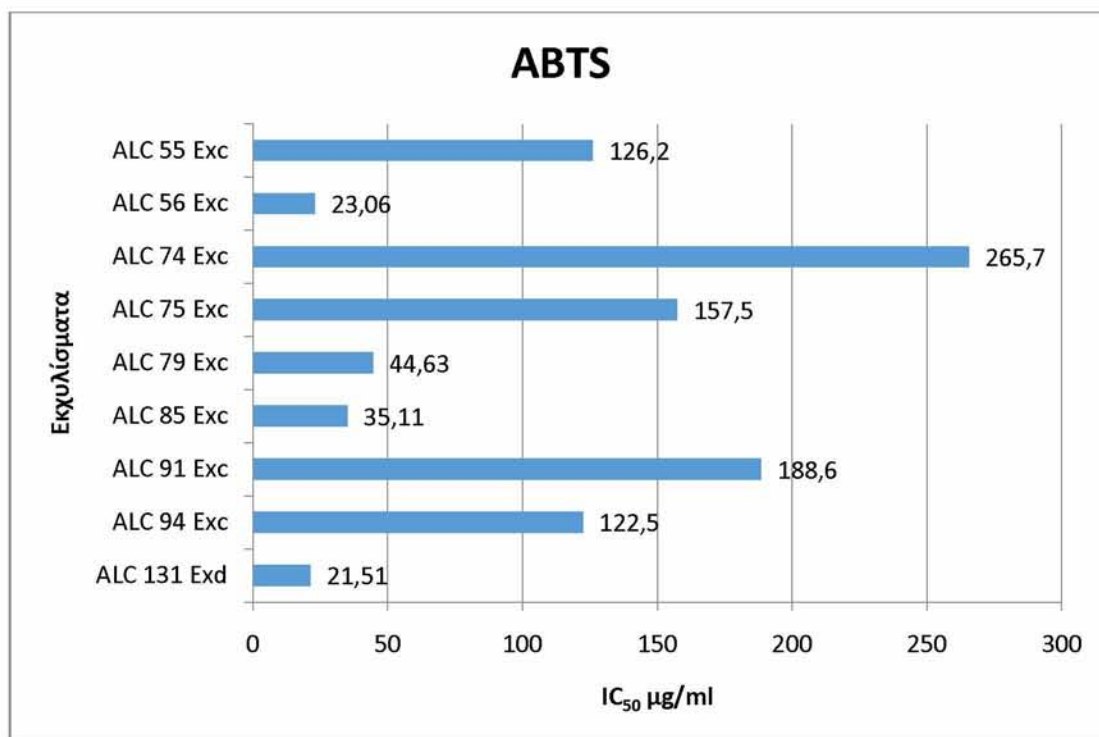
Διάγραμμα 4.2.7. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 91 Exc (*Oropanax chironium*).



Διάγραμμα 4.2.8. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 94 Exc (*Psoralea bituminosa*).

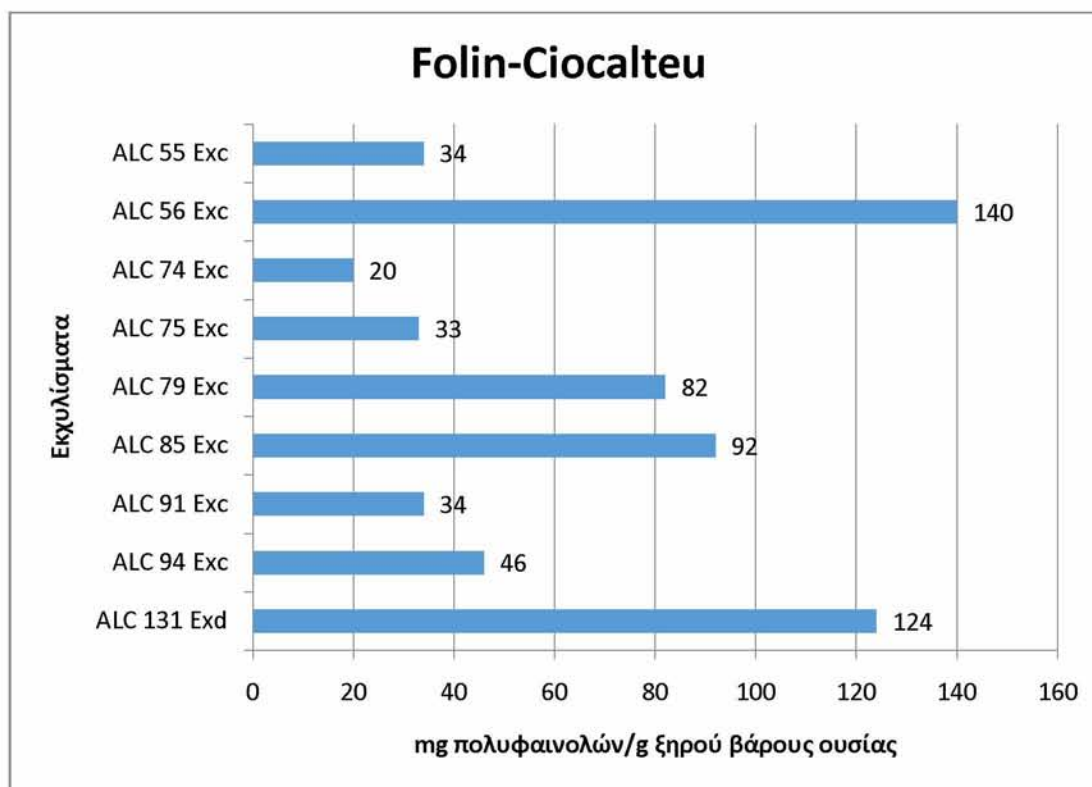


Διάγραμμα 4.2.9. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα ALC 131 Exd (*Origanum onites*).



Διάγραμμα 4.2.10. Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που προκύπτουν για την εξουδετέρωση της ρίζας ABTS από τα υπό εξέταση εκχυλίσματα.

4.3. Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (Total Polyphenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu



Διάγραμμα 4.3.1. Απεικονίζονται οι τιμές TPC (mg/g ξηρού βάρους ουσίας) των υπό εξέταση εκχυλισμάτων.

Στο διάγραμμα 4.3.1 παρουσιάζονται οι τιμές των ολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, για όλα τα εκχύλιστα που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Mentha spicata* (ΑΛΚ 56 Exc) εμφανίζει υψηλότερες τιμές στα ολικά φαινολικά με **140mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**, ακολουθούμενο από το υδατικό εκχύλισμα του *Origanum onites* (ΑΛΚ 131 Exd) με **124mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**. Έπειτα ακολουθούν τα μεθανολικά εκχύλιστα του *Achillea millefolium* (ΑΛΚ 85 Exc) με **92mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**, του *Anthemis sp.* (ΑΛΚ 79 Exc) με **82mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**, του *Psoralea bituminosa* (ΑΛΚ 94 Exc) με **46mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα μεθανολικά εκχύλιστα των φυτών *Coriander sativum* (ΑΛΚ 55 Exc) και *Oropanax chironium* (ΑΛΚ 91 Exc) εμφανίζουν ακριβώς την ίδια τιμή με **34mg**

πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας ενώ και το φυτό *Senecio eubaeus* εμφανίζει σχεδόν την ίδια τιμή με **33mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**. Τέλος, στην τελευταία θέση βρίσκεται το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Helleborus cyclophyllus* (ALC 74 Exc) με **20mg πολυφαινολών/g ξηρού βάρους ουσίας**.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί μεγάλο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες και τη δράση που έχουν, κυρίως στον ανθρώπινο οργανισμό. Έρευνες που έχουν γίνει σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους δείχνουν ότι αρκετές πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην πρόληψη ή/ και στην θεραπεία για διάφορες ασθένειες, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καρκίνο και παχυσαρκία (Xiao JB, Hogger P., 2015),(Fujiki H, Sueoka E, Watanabe T, Suganuma M., 2015), (Singh A, Holvoet S, Mercenier A., 2011).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων από τα είδη των φυτών *Achillea millefolium*, *Anthemis sp.*, *Coriander sativum*, *Helleborus cyclophyllus*, *Mentha spicata*, *Oropanax chironium*, *Origanum onites*, *Psoralea bituminosa*, *Senecio eubaeus*.

Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών εκχυλισμάτων. Όμως, η χημική πολυπλοκότητα των εκχυλισμάτων θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποτελέσματα με αρκετές διαφορές ανάλογα με τις μεθόδους και τεχνικές που χρησιμοποιούνται. Για αυτό στην συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS in vitro, για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική δράση των 9 φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν. Επιπροσθέτως, οι πολυφαινόλες θεωρούνται μία μεγάλη ομάδα ουσιών που συμβάλλει στην αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων. Για αυτό σε αυτή τη μελέτη μετρήθηκαν οι τιμές IC₅₀ των 9 φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας τις δύο προαναφερθέντες μεθόδους και επίσης το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και έπειτα συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Με βάση τις τιμές των IC₅₀ από τα 9 εκχυλίσματα, αυτά που παρουσίασαν την σημαντικότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•] ήταν το ALC 131 Exd (*Origanum onites*), και το ALC 56 Exc (*Mentha spicata*). Το εύρος των τιμών IC₅₀ για τα 9 εκχυλίσματα κυμαινόταν από 25,78μg/ml έως 317,2μg/ml. Τα πιο ισχυρά

εκχυλίσματα ήταν το υδατικό του *Origanum onites* (ALC 131 Exd) με IC₅₀ 25,78μg/ml και το μεθανολικό του *Mentha spicata* (ALC 56 Exc) με IC₅₀ 31,91μg/ml αντίστοιχα, ενώ τα πιο ασθενή ήταν τα μεθανολικά εκχυλίσματα (ALC 91 Exc) του *Oropanax chironium* με τιμή IC₅₀ 313μg/ml και (ALC 74 Exc) του *Helleborus cyclophyllus* με τιμή IC₅₀ 317,2μg/ml.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS^{•+}, έδειξε ότι τα πιο ισχυρά εκχυλίσματα ήταν το υδατικό του *Origanum onites* (ALC 131 Exd) και το μεθανολικό του *Mentha spicata* (ALC 56 Exc) με τιμές IC₅₀ 21,51μg/ml και 23,06 μg/ml αντίστοιχα. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 21,51μg/ml έως 265,7μg/ml. Είναι, αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα έχουν την ίδια κατάταξη(σειρά) όσον αφορά την δραστηρότητά τους (μέθοδος DPPH και μέθοδος ABTS) αν και υπάρχει διαφορά στην χημική δομή των δύο εξεταζόμενων ριζών. Αυτό σημαίνει πως πιθανόν οι ίδιες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι υπεύθυνες και για την εξουδετέρωση των δύο ριζών.

Επιπλέον, από την ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, παρατηρήθηκε ότι το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το μεθανολικό του *Mentha spicata* (ALC 56 Exc) με τιμή 140 mg πολυφαινόλων/g ξηρού βάρους ουσίας ενώ το υδατικό εκχύλισμα του *Origanum onites* (ALC 131 Exd) ήταν το δεύτερο πιο ισχυρό με τιμή 124 mg πολυφαινόλων/g ξηρού βάρους ουσίας με μελέτες να δείχνουν ότι στο εκχύλισμα του *Origanum onites* η καρβακρόλη είναι μια από τις κύριες πολυφαινόλες (Pizzale L., et al., 2002). Όσον αφορά το πιο ασθενές εκχύλισμα, αυτό ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Helleborus cyclophyllus* (ALC 74 Exc) με 20 mg πολυφαινόλων/g ξηρού βάρους ουσίας. Συνεπώς τα δύο πιο ισχυρά εκχυλίσματα και το πιο ασθενές εκχύλισμα σύμφωνα με τις μεθόδους DPPH και ABTS βρέθηκε ότι είχαν τις περισσότερες πολυφαινόλες και τις λιγότερες πολυφαινόλες αντίστοιχα. Όμως ενώ το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Origanum onites* φαίνεται να εμφανίζει την τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (σύμφωνα με τις μεθόδους DPPH και ABTS), έχει λιγότερες πολυφαινόλες από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Mentha spicata*. Αυτό δείχνει ότι σε αυτό το φυτό και η ποιοτική πολυφαινολική σύσταση είναι σημαντική για την αντιοξειδωτική του δράση. Κατά συνέπεια, υπήρξε σχετική συσχέτιση αλλά όχι απόλυτη ανάμεσα στην ικανότητα εξουδετέρωσης των εκχυλισμάτων της ρίζας του DPPH και του ABTS και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υδατικό εκχύλισμα του *Origanum onites* (ALC 131 Exd) και το μεθανολικό εκχύλισμα του *Mentha spicata* (ALC 56 Exc) in vitro φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Και τα υπόλοιπα όμως εκχυλίσματα έδειξαν ισχυρή έως μέτρια αντιοξειδωτική δράση. Αξιοσημείωτο είναι ότι σύμφωνα με μελέτες σε άλλες χώρες, που έχουν γίνει σε κάποια από τα φυτά που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση τους. Πιο συγκεκριμένα σε εκχυλίσματα του φυτού *Mentha spicata* από το Ιράν βρέθηκαν αρκετά υψηλότερες τιμές IC₅₀ (Nickavar B., et al. 2008),(HosseiniMehr SJ., et al. 2007) σε σχέση με το φυτό από Ελλάδα που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη. Αυτό πιθανολογεί διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση που μπορεί να έχουν σχέση με τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το κλίμα, ο τύπος του εδάφους αλλά και διαφορές στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των φυτικών εκχυλισμάτων. Παρόλα αυτά, τα φυτικά εκχυλίσματα των ελληνικών φυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν τα συστατικά αυτών των εκχυλισμάτων, ξεκινώντας με τα πιο ισχυρά, ώστε να γίνει περαιτέρω έρευνα για τα βιοδραστικά συστατικά, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση αλλά και να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί. Οι εφαρμογές της έρευνας αυτής θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων όπως βιολειτουργικά τρόφιμα, είτε άλλου τύπου προϊόντα, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρωμάτων διατροφής αλλά επίσης θα μπορούσαν να οδηγήσουν και στην αύξηση του ενδιαφέροντος γύρω από την έρευνα αυτοφυών φυτών της Ελλάδας η οποία είναι μία χώρα με τεράστια ποικιλομορφία χλωρίδας η οποία θεωρείται και ένας από τους θησαυρούς της.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adlercreutz H, Mazur W (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 29, 95-120.

Berg J. Tymoczko J, Gregory J, Stryer L. *BIOXHMEIA* (έκδοση 2017)

Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.* 1998 24:133–138.

Bettters J., Criswell D., Shanely A., Van Gammeren D., Falk D., DeRuisseau K., Deering M., Yimlamai T. and Powers S. Trolox Attenuates Mechanical Ventilation–induced Diaphragmatic Dysfunction and Proteolysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2004

Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, Volume 28, Issue 1, 1995.

Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A., Akpulat A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology.*

Caniato R., Filippini R., Piovan A., Puricelli L., Borsarini A., Cappelletti E. (2003) Melatonin in Plants. *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism* pp 593-597.

Cheeseman KH, Slater TF, “An introduction to free radical biochemistry” : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.

Chun JN, Cho M, So I, Jeon JH (2014). The protective effects of *Schisandra chinensis* fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: a review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia.* 97, 224-33

Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26.

Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise Immunology Review* [01 Jan 2001, 7:66-89]

Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36 (4), 327-358.

Fujiki H., Sueoka E., Watanabe T., Suganuma M. (2015). Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds. *Journal of Cancer Prevention*.

Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem.* 2002 Mar-Apr;383(3-4):375-88.

Girotti, A.W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med*, 1(2), 87-95

Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 1988;20(1):55–59.

Guo, Z. M.; Van Remmen, H.; Yang, H.; Chen, X. L.; Mele, J.; Vijg, J.; Epstein, C. J.; Ho, Y. -S.; Richardson, A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxLDL induced apoptosis in mouse aorta cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1131– 1138; 2001

Halliwell, B. et al., Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992, 119: 598.

Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine.* 5th Edition, Oxford University Press, New York.

Herrera E., Barbas C., Vitamin E: action, metabolism and perspectives. Journal of Physiology and Biochemistry. March 2001, Volume 57, Issue 1

Hosseinimehr SJ., Pourmorad F., Shahabimajd N., Shahrbandy K., Hosseinzadeh R. (2007). In vitro Antioxidant Activity of Polygonum hyrcanicum, Centaurea depressa, Sambucus ebulus, Mentha spicata and Phytolacca americana. Pakistan Journal of Biological Sciences 10.

Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S., Boskou D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1994 233:346-357.

Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. Free Radical Biology and Medicine 2002; 32 (9): 790-6.

Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, American Society for Clinical Nutrition, 79:727-47

Masters, C., Pegg, M., Crane, D., (1986). On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. Molecular Cell Biochemistry, 70, (2), 113-120.

May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. Free Radic Biol Med 1996; 20 (4): 543

Miller NJ, Rise-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A , A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, Clinical Science (London) 1993.

Mozaffarian, D.; Rimm, E. B.; King, I. B.; Lawler, R. L.; McDonald, G. B.; Levy, W. C. Trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1521–1525; 2004

Mylonas C and Kouretas D. Lipid Peroxidation and Tissue Damage. *In Vivo*. Αθήνα, 1999.

Nickavar B., Alinaghi B. and Kamalinejad M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Properties of Five Mentha Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*.

Nikolaidis G., Jamurtas A., Paschalis V., Fatouros I., Koutedakis Y., Kouretas D. The Effect of Muscle-Damaging Exercise on Blood and Skeletal Muscle Oxidative Stress. *Sports medicine*, 2008.

Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Überegger E., Conte LS. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.

Priftis A., Stagos D., Konstantinopoulos K., Tsitsimpikou C., Spandidos DA., Tsatsakis AM., Kouretas D. (2015). Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*.

Prior R, Xianli W, Schaich K, “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric Food Chem*, , 53 (6) : 1841-1856, 2005

Qiu X., Brown K., Hirschey M., Verdin E., Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation, *Cell metabolism*. 2010

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27(1-2), 69-74.

Reid, M.B., Haack, K.E., Franchek, K.M., Valberg, P.A., Kobzik, L., West, M.S. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* 73, 1797–1804.

Reid M.B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Medicine and Science in Sports and Exercise* [01 Mar 2001, 33(3):371-376]

Reiter RJ., Carneiro R., Oh C.-S. Melatonin in Relation to Cellular Antioxidative Defense Mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29(8): 363-372

Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956

Saroglou V., Dorizas N., Kypriotakis Z., Skaltsa H. (2006). Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. *Journal of Chromatography A*.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot.* 2002 May;53(372):1305-19.

Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *ExpPhysiol* 82:291-295

Singh A., Holvoet S., Mercenier A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*.

Traber MG., Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free radical biology and medicine. 2007

Valavanidis A, “Free radicals in organic chemistry”, University of Athens, 2006.

Wilson RL, “Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In biochemical mechanism of liver injuries”, New York Academic Press: 123-224, 1978.

Witztum, J.L.; Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? Trends Cardiovasc. Med. 11:93– 102; 2001

Xiao JB., Hogger P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. Current Medicinal Chemistry.

Zaloga, G. P.; Harvey, K. A.; Stillwell, W.; Siddiqui, R. Trans fatty acids and coronary heart disease. Nutr. Clin. Prac. 21:505–512; 2006

Διαμαντίδης Γ. (2007). Εισαγωγή στη Βιοχημεία, University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Δόρδας Χ. (2009). Μαθήματα γενικής γεωργίας, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Ζερφυρίδης Γ. (1998). Διατροφή του ανθρώπου, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη.

Καββαδάς Δ. (1956). Εικονογραφημένον βοτανικόν – φυτολογικόν λεξικόν

Κουρέτας Δ., Στάγκος Δ. (2017). Εργαστηριακές σημειώσεις: Μεταπτυχιακό πρόγραμμα « Βιοτεχνολογία – Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος».

Κουτσός Θ. (2006). Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Ντουνούση Ε.Χ., Τσελέπης Α., Σιαμόπουλος Κ.Χ. (2009) Οξειδωτικό στρες, μηχανισμοί δράσης και ο ρόλος του στη χρόνια νεφρική νόσο. Ελληνική Νεφρολογία 21 (1), 34-45.

Στάγκος Δ. Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα και φυτικές πολυφαινόλες από Ελληνικές ποικιλίες αμπέλου. 2006